



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

***“Síntesis de lecitinas derivadas de ácido araquidónico
parcialmente oxidado”***

Autor: Dña. Cristina Fraile Sánchez

Tutor: D. Alfonso Pérez Encabo

ÍNDICE

1.	GLOSARIO DE ABREVIATURAS	4
2.	RESUMEN / ABSTRACT.....	5
3.	INTRODUCCIÓN	6
4.	ANTECEDENTES.....	9
4.1.	<i>Síntesis de 1-acil-sn-glicero-3-fosfolina (2-LPC)</i>	9
4.2.	<i>Síntesis de bromoalquinos</i>	11
4.3.	<i>Síntesis de poliinos por acoplamiento con magnesianos</i>	13
4.4.	<i>Reducción de estereoselectiva de poliinos</i>	14
4.5.	<i>Síntesis del ácido 4-metoxicarbonilbutanoico</i>	14
4.6.	<i>Síntesis del ácido 4-formilbutanoico</i>	14
4.7.	<i>Síntesis del ácido 5-ol-8,11,14-icosatrienoico</i>	15
4.8.	<i>Síntesis de GPL</i>	15
5.	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	16
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
6.1.	<i>Síntesis de cloruro de palmitoílo</i>	18
6.2.	<i>Síntesis de 1-palmitoíl-sn-glicero-3-fosfolina (2-LPC)</i>	18
6.3.	<i>Síntesis de 1-bromo-2-octino</i>	19
6.4.	<i>Síntesis de 2,4-undecadiín-1-ol</i>	21
6.5.	<i>Síntesis de 1-bromo-2,4-undecadiino</i>	22
6.6.	<i>Síntesis del ácido 4-metoxicarbonilbutanoico</i>	23
7.	CONCLUSIONES.....	24
8.	MATERIALES Y MÉTODOS	24
8.1.	<i>Síntesis de cloruro de palmitoílo (4)</i>	25
8.2.	<i>Síntesis de 1-palmitoíl-sn-glicero-3-fosfolina (2-LPC) (5)</i>	25
8.3.	<i>Síntesis de 1-bromo-2-octino (7)</i>	26
8.4.	<i>Síntesis de 2,4-undecadiín-1-ol (10)</i>	26
8.5.	<i>Síntesis de 1-bromo-2,4-undecadiino (11)</i>	27
8.6.	<i>Síntesis del ácido 4-metoxicarbonilbutanoico (9)</i>	27
9.	ANEXO: ¹ H, ¹³ C, HSQC, MS	28

1. GLOSARIO DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
DBTO	Óxido de dibutilestaño
DCC	N,N'-Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DIBAL	Hidruro de diisobutilaluminio
DMAP	4,4-Dimetilaminopiridina
FA	Ácido graso
GPC	<i>sn</i> -Glicero-3-fosforilcolina
GPL	Glicerofosfolípido
LPC	Lisofosfatidilcolina
LPL	Lisofosfolípido
NMR	Resonancia magnética nuclear
PL	Fosfolípido
ppm	Partes por millón
py	Piridina
rt	Temperatura ambiente
<i>sn</i>	Nomenclatura estéreo-específica
TEA	Trietilamina
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano

2. RESUMEN / ABSTRACT

La síntesis de fosfolípidos (PLs) y lisofosfolípidos (LPLs) tiene interés en el estudio de procesos inflamatorios donde están involucrados y, es por ello que, este trabajo de fin de grado tiene como objetivo la síntesis de una lecitina que porta dos cadenas alquílicas en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2, en concreto, un residuo derivado del ácido araquidónico (20:3 (8,11,14) con un grupo hidroxilo en C5) en *sn*-1, y el ácido palmítico (16:0) en *sn*-2.

El compuesto final se sintetiza a partir de 2-lisofosfatidilcolina (2-LPC) y un derivado del ácido araquidónico. A su vez, 2-LPC se obtiene a partir de *sn*-glicerol-3-fosforilcolina (GPC) y cloruro de palmitoílo y, el derivado del ácido araquidónico, a partir de 2-octín-1-ol y anhídrido glutárico.

Palabras clave: fosfolípido; lisofosfolípido; lisofosfatidilcolina; lecitina.

The synthesis of phospholipids (PLs) and lysophospholipids (LPLs) has interest in the study of inflammatory processes where they are involved and, for this reason, this final degree project has as objective the synthesis of a lecithin that carries two alkyl chains in the *sn*-1 and *sn*-2 positions, specifically, a residue derived from arachidonic acid (20:3 (8,11,14) with a hydroxyl group at C5) in *sn*-1, and palmitic acid (16:0) in *sn*-2.

The final compound is synthesized from 2-lysophosphatidylcholine (2-LPC) and the arachidonic acid derivative. In turn, 2-LPC is obtained from *sn*-glycerol-3-phosphorylcholine (GPC) and palmitoyl chloride and, the derived from arachidonic acid, from 2-octin-1-ol and glutaric anhydride.

Key words: phospholipid; lysophospholipid; lysophosphatidylcholine; lecithin.

3. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales mecanismos de defensa inespecífica frente a patógenos es el proceso de inflamación. Entre los mediadores químicos que desencadenan la respuesta inflamatoria destacan los eicosanoides, moléculas de carácter lipídico originadas por la oxidación de ácidos grasos (FAs) poliinsaturados esenciales de 20 átomos de carbono, principalmente el ácido araquidónico (AA)^[1].

El AA o ácido 5,8,11,14-eicosatetranoico es un FA poliinsaturado de 20 átomos de carbono (20:4) del tipo omega-6 (n-6), pues presenta un doble enlace entre los carbonos 6 y 7 contando desde el extremo metilo de la molécula (Figura 1). Es crucial en la inmunidad innata al ser precursor de los eicosanoides, mediadores que actúan en los procesos de inflamación y sistema nervioso^[1,2]

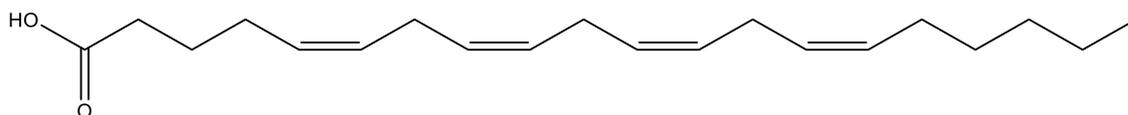


Figura 1. Ácido araquidónico 20:4 (5,8,11,14) n-6.

Debido a la gran actividad biológica del AA y, en especial de sus derivados, así como cualquier análogo de las familias omega-3, omega-6 y omega-9 y los fosfolípidos que lo portan, es necesario un control exhaustivo y eficaz de sus niveles^[3]. Con este fin, una continua movilización desde los glicerofosfolípidos regula la disponibilidad de AA libre y sus derivados, lo que frecuentemente representa un paso limitante en la generación de eicosanoides^[2].

Los glicerofosfolípidos (GPLs) son los principales componentes de las membranas celulares. En cuanto a su estructura, presentan un esqueleto de glicerol fosfato unido a una cabeza polar. Las tres posiciones posibles del glicerol se nombran de forma estéreo-

¹ Alma Astudillo del Valle. Mecanismos de control de los niveles de ácido araquidónico en monocitos y macrófagos. *Instituto de Biología y Genética Molecular, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Universidad de Valladolid (2011)*.

² Luis Gil Gómez Sesma. Estudio lipídico de la movilización de ácido araquidónico asociada a la respuesta inmune innata. *Instituto de Biología y Genética Molecular, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Universidad de Valladolid (2013)*.

³ Jesús Balsinde. Marcadores lipídicos de activación y su posible utilidad en el diagnóstico temprano de enfermedades. *Instituto de Biología y Genética Molecular, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Universidad de Valladolid (2015)*.

específica (*sn*, stereospecific nomenclature) y, en todos los casos, el grupo fosfato se encuentra en la posición *sn*-3. Atendiendo a la cabeza polar unida al grupo fosfato, se pueden distinguir diversas clases de GPLs: por ejemplo, la unión de colina origina *sn*-glicero-3-fosfocolina (GPC) (Figura 2)^[2,4].

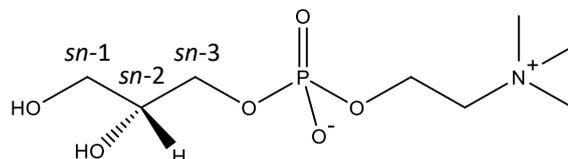


Figura 2. *sn*-glicero-3-fosfocolina (GPC).

En las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 se unen residuos de acilo derivados de ácidos grasos, cuya unión a GPC origina fosfatidilcolina o lecitina (Figura 3). En la posición *sn*-2 de los GPLs es muy común la unión de ácidos grasos insaturados y, en células inflamatorias, es casi exclusivamente AA o un derivado de este.

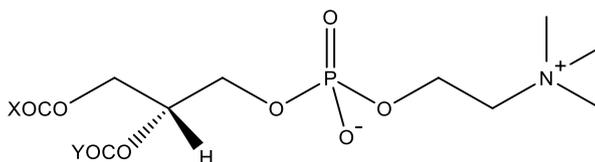


Figura 3. Fosfatidilcolina o lecitina (X, Y=cadenas alquílicas).

Cuando solo una de las posiciones *sn* está acilada, el compuesto recibe el nombre de lisofosfolípido (LPL): 1-LPL o 2-LPL si la posición *sn*-1 o *sn*-2 está libre respectivamente (Figura 4).

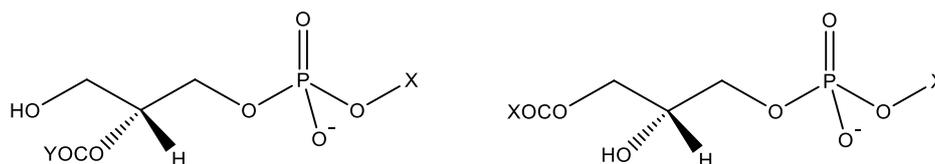


Figura 4. Estructuras del 1-lisofosfolípido (1-LPL) y 2-lisofosfolípido (2-LPL) (X=grupo polar; Y, Z=cadenas alquílicas).

² Luis Gil Gómez Sesma. Estudio lipidómico de la movilización de ácido araquidónico asociada a la respuesta inmune innata. *Instituto de Biología y Genética Molecular, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Universidad de Valladolid (2013)*.

⁴ Daniela Küllenberg, Lenka A Taylor, Michael Schneider, and Ulrich Massing. Health effects of dietary phospholipids. *Lipids Health Dis.* **2010**, 11:3. doi: 10.1186/1476-511X-11-3

En particular, los 2-LPLs permiten controlar los niveles celulares de AA libre u otros derivados, pues estos se pueden liberar por hidrólisis con fosfolipasas. Por tanto, también han demostrado estar involucrados en procesos de inflamación^[2,5].

El planteamiento de este trabajo está englobado dentro de una investigación más amplia, coordinado por el Dr. Jesús Balsinde del Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM) de Valladolid, y la Universidad de Valladolid (UVa). En este, se pretende estudiar el mecanismo de actuación del AA y otros derivados en procesos de inflamación del organismo, introducidos de diferentes formas, como por ejemplo, a partir de fosfatidilcolinas. Es por ello que, el objetivo planteado de este trabajo es obtener una lecitina que porte un derivado del AA parcialmente oxidado en la posición *sn*-2 (Figura 5).

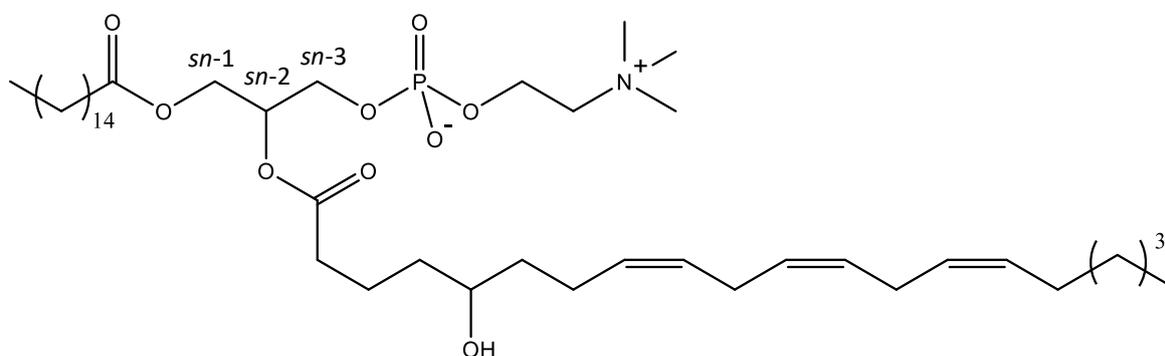


Figura 5. Estructura del compuesto final: lecitina con esqueleto de glicerol esterificado en *sn*-3 con fosfocolina, en *sn*-2 con un derivado del ácido araquidónico y en *sn*-1 con ácido palmítico.

Además de su papel en procesos de inflamación, recientemente se ha encontrado que los fosfolípidos (PLs) son también esenciales para la regulación de funciones celulares por hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento, como también en numerosos procesos fisiológicos y patológicos. Es por ello que su síntesis tiene gran interés en las áreas de la química de membrana y bioquímica^[6].

² Luis Gil Gómez Sesma. Estudio lipidómico de la movilización de ácido araquidónico asociada a la respuesta inmune innata. *Instituto de Biología y Genética Molecular, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Universidad de Valladolid (2013)*.

⁵ Paola D'Arrigo and Stefano Servi. Synthesis of Lysophospholipids. *Molecules* **2010**, *15*, 1354-1377. doi: 10.3390/molecules15031354

⁶ Paola D'Arrigo et al. A practical selective synthesis of mixed short/long chains glycerophosphocholines. *Chemistry and Physics of Lipids* **2007**, *147*, 113-118. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2007.03.008

4. ANTECEDENTES

4.1. Síntesis de 1-acil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (2-LPC)

Los 2-lisofosfatilcolinas (2-LPCs) son los LPLs más estudiados. Se ha demostrado que participan en la regulación de la transcripción génica, la mitogénesis, la quimiotaxis de monocitos, la relajación del músculo liso, la activación plaquetaria y otros muchos artículos describen sus efectos reguladores^[5]. Presentan un esqueleto de glicerol esterificado con un ácido graso en *sn*-1 y fosfocolina en *sn*-3, estando la posición *sn*-2 libre (Figura 6).

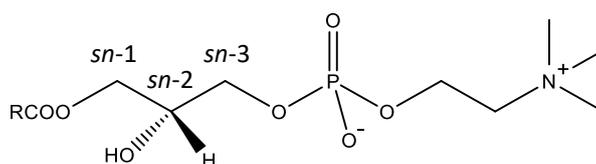


Figura 6. 1-acil-*sn*-glicero-3-fosfocolina o 2-lisofosfatidilcolina (2-LPC) (R=cadena alquílica).

Para la síntesis del compuesto final, se requiere inicialmente de la formación de 2-LPC en el que se ha incorporado ácido palmítico en la posición *sn*-1. En la bibliografía se encuentran descritas diversas estrategias:

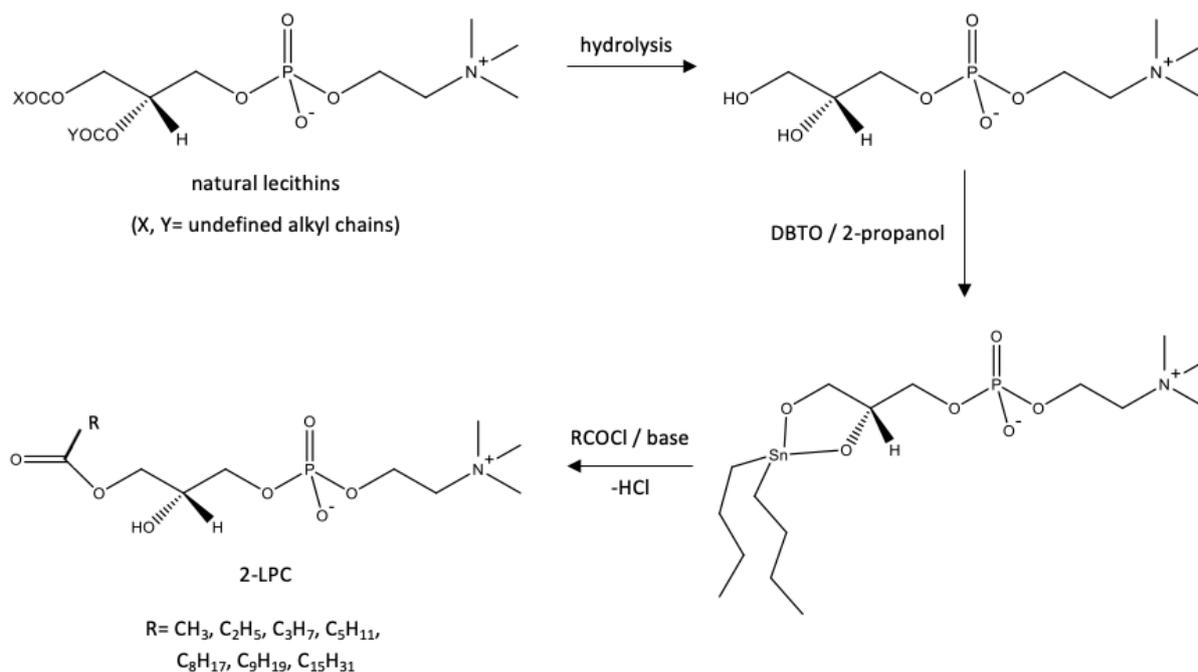
4.1.1. Acilación mediada por estaño

La síntesis de 2-LPC, así como de cualquier otro PL, suele realizarse a partir de GPC, pues puede obtenerse fácilmente por hidrólisis de lecitinas naturales. La reacción más habitual es una acilación mediada por estaño, más concretamente, una acilación quimioselectiva de la posición *sn*-1 de GPC aprovechando la alta reactividad y selectividad de los cetales de estaño formados *in situ*. Esto es, formación del derivado de estaño por reacción de GPC con DBTO en 2-propanol y posterior acilación con el cloruro de ácido correspondiente en presencia de una base (Esquema 1)^[5-7].

⁵ Paola D'Arrigo and Stefano Servi. Synthesis of Lysophospholipids. *Molecules* **2010**, *15*, 1354-1377. doi: 10.3390/molecules15031354

⁶ Paola D'Arrigo et al. A practical selective synthesis of mixed short/long chains glycerophosphocolines. *Chemistry and Physics of Lipids* **2007**, *147*, 113-118. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2007.03.008

⁷ Natalia Niezgoda et al. Synthesis of Phosphatidylcholine with Conjugated Linoleic Acid and Studies on Its Cytotoxic Activity. *Aus. J. Chem.* **2013**, *66*, 354-361. doi: 10.1071/CH12404

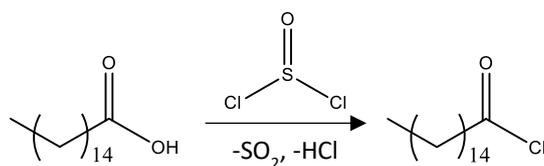


Esquema 1

Como ya se ha indicado, la reacción ocurre con una alta quimioselectividad y proporciona rendimientos comparables con derivados de ácidos grasos saturados e insaturados de diferentes longitudes.

Debido a las ventajas que presenta este procedimiento, es el que se utiliza para la síntesis del compuesto **5**, 1-palmitoil-*sn*-glicero-2-fosfolina (2-LPC). Previo a ello, es necesario la síntesis del cloruro de ácido correspondiente.

En este caso, la acilación tiene lugar con cloruro de palmitoil, que se obtiene por reacción de ácido palmítico con cloruro de tionilo (Esquema 2)^[8].



Esquema 2

4.1.2. Inserción directa

Otra posibilidad es insertar el ácido graso directamente en la GPC. El método descrito utiliza Kieselguhr (tierra de diatomeas) como catalizador y reactivo, que puede

⁸ Severio Zuffanti. Preparation of acyl chlorides with thionyl chloride. *J. Chem. Educ.* **1948**, *25*, 481. doi: 10.1021/ed025p481

En cuanto al mecanismo, se pueden distinguir cuatro etapas: formación de la sal tribromometiluro de bromotrifetilfosfonio, deprotonación del alcohol y formación del alcóxido correspondiente que actúa como contraión del catión bromotrifetilfosfonio, sustitución nucleófila del bromo por el alcóxido y, finalmente, formación del bromuro de alquilo y óxido de trifetilfosfina (Figura 7)^[11].

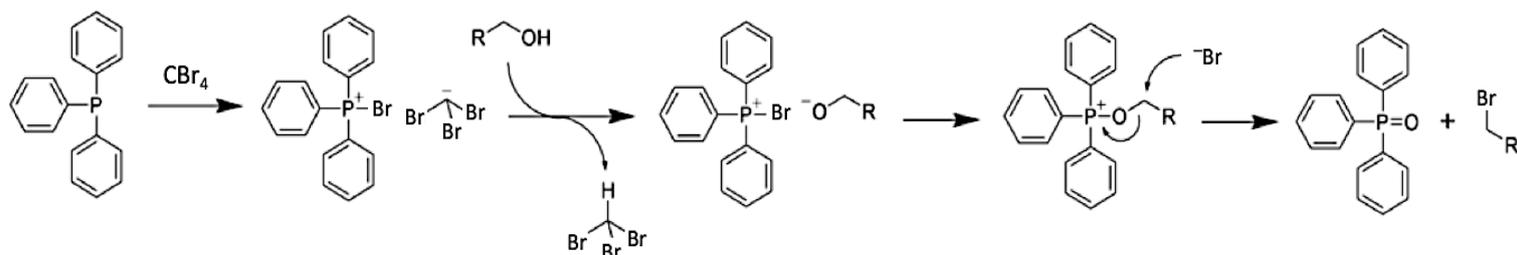
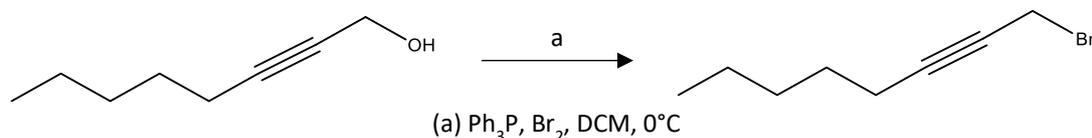


Figura 7. Mecanismo de la reacción con CBr_3 y Ph_3P .

4.2.2. Reacción con Br_2 y Ph_3P

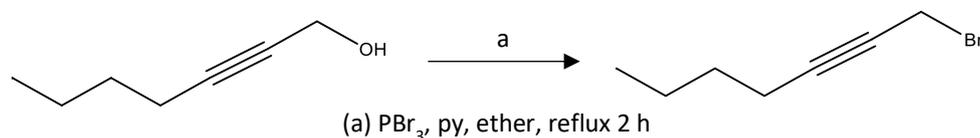
Consiste en la reacción con una mezcla de Ph_3P y Br_2 . En cuanto al mecanismo, es similar a la descrita en el apartado 4.2.1. En estas condiciones, se encuentra descrita la síntesis de 1-bromo-2-octino (Esquema 5)^[12].



Esquema 5

4.2.3. Reacción con PBr_3

Consiste en la reacción con PBr_3 en presencia de una base como piridina. En estas condiciones, se encuentra descrita la síntesis de 1-bromo-2-heptino (Esquema 6)^[13].



Esquema 6

¹¹ Jose G. Calzada and John Hooz. Geranyl Chloride. *Organic Synthesis* **1974**, 54, 63. doi: 10.15227/orgsyn.054.0063

¹² Matthew P. Meyer and Judith P. Klinman. *J Am Chem Soc.* **2011**, 133, 430-439. doi: 10.1021/ja1050742

¹³ Melvin S. Newman and John H. Wotz. The Preparation of the Six n-Octynoic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, 71, 1292-1297. doi: 10.1021/ja01172a042

En cuanto al mecanismo, primero se origina un dibromofosfito y, finalmente, por vía S_N2 el haluro correspondiente (Figura 8)^[14].

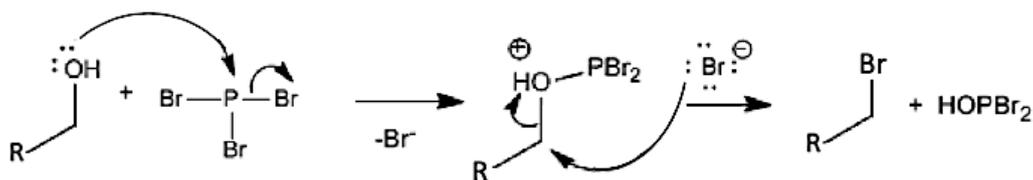


Figura 8. Mecanismo de la reacción con PBr₃.

Estas reacciones tienen interés para la síntesis de 1-bromo-2-octino (**7**), 1-bromo-2,4-undecadieno (**11**) y 1-bromo-3,6,9-pentadecatrieno (**14**), necesarios para la obtención del compuesto final.

4.3. Síntesis de poliinos por acoplamiento con magnesianos

Los organomagnesianos o reactivos de Grignard, de fórmula general RMgX donde R es un resto alquílico o arílico y X un halógeno, son muy útiles en reacciones de adición nucleófila. En este trabajo, su empleo tiene especial interés para la síntesis de 2,4-undecadién-1-ol (**10**) y 3,6,9-pentadecatrién-1-ol (**13**) a partir del bromuro y alcohol correspondientes.

El acoplamiento se lleva a cabo con RMgX en presencia de un haluro de Cu (I) que actúa como catalizador y, en caso de que fuera necesario, RMgX se prepara por reacción del haluro correspondiente (RX) con Mg. En la bibliografía se encuentran descrita la síntesis del compuesto **10** (Esquema 7) y otros análogos con altos rendimientos^[15-18].

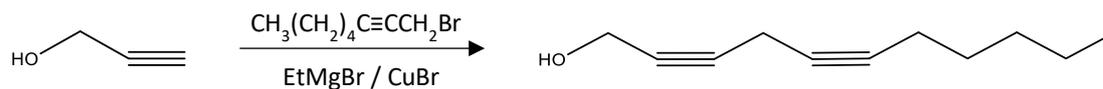
¹⁴ Germán Fernández. Síntesis de Haloalcanos a partir de Alcoholes. *Química Orgánica*. <https://www.quimicaorganica.org/alcoholes/417-sintesis-de-haloalcanos-a-partir-de-alcoholes.html>

¹⁵ Francis A. J. Kerdesky et al. Synthesis and 5-Lipoxygenase Inhibitory Activity of 5-Hydroperoxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic Acid Analogues. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1177-1186. doi: 10.2021/jm00390a010

¹⁶ Devanand L. Luthria and Howard Sprecher. Synthesis of Ethyl Arachidonate-19,19,20,20-d₄ and Ethyl Dihomo- γ -linolenate-19,19,20,20-d₄. *Lipids* **1993**, *28*, 853-856. doi: 10.1007/BF02536242

¹⁷ Subhash P. Khanapure et al. Total Synthesis of a Potent Proinflammatory 5-Oxo-EETE and Its 6,7-Dihydro Biotransformation Product. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 337-342. doi: 10.1021/jo9716993

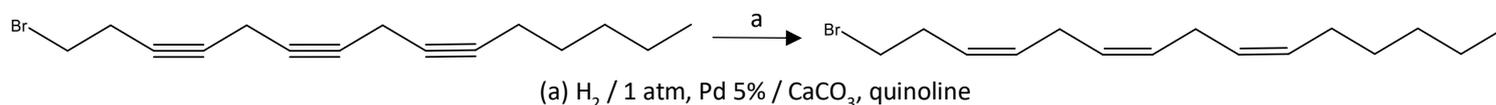
¹⁸ Yoshitomo Suhara et al. Synthesis and biological evaluation of several structural analogs of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Biorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, *15*, 854-867. doi: 10.1016/j.bmc.2006.10.049



Esquema 7

4.4. Reducción de estereoselectiva de poliinos

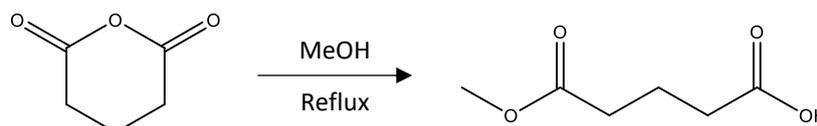
La reducción de alquinos al alqueno correspondiente puede realizarse de diversas formas, atendiendo a la estereoquímica del producto final. Si se desea obtener el alqueno Z, la reacción consiste en una hidrogenación en presencia del catalizador de Lindlar. Esto es, H_2 en presencia de Pd precipitado sobre BaSO_4 o CaCO_3 y tratado con acetato de plomo (II) o quinoleína, es decir, envenenamiento del catalizador para reducir su actividad (Esquema 8)^[19].



Esquema 8

4.5. Síntesis del ácido 4-metoxicarbonilbutanoico

La síntesis de este compuesto puede llevarse a cabo por apertura del anillo de anhídrido glutárico en metanol (Esquema 9)^[20].



Esquema 9

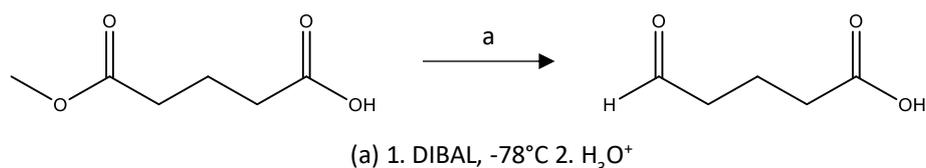
4.6. Síntesis del ácido 4-formilbutanoico

La reducción de ésteres a aldehídos se puede realizar con hidruros metálicos y, muy frecuentemente, se lleva a cabo con DIBAL y posterior hidrólisis (Esquema 10). Las condiciones de reacción requieren bajas temperaturas^[21].

¹⁹ Alex Ibhaddon and Sushil Kansal. The Reduction of Alkynes Over Pd-Based Catalyst Materials - A Pathway to Chemical Synthesis. *J Chem Eng Process Technol* **2018**, 9:2. doi: 10.4172/2157-7048.1000376

²⁰ P. M. Fresneda, P. Molina y A. Soler. Síntesis de α -lactonas. *Universidad de Murcia*.

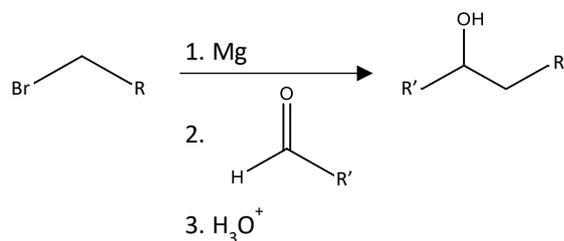
²¹ James Ashenurst. Di-isobutyl Aluminum Hydride (DIBAL). *Organic Chemistry* **2020**.



Esquema 10

4.7. Síntesis del ácido 5-ol-8,11,14-icosatrienoico

La síntesis de este derivado del ácido araquidónico consiste en una reacción de adición nucleófila entre un organomagnesiano, preparado por reacción del haluro correspondiente con Mg, y un aldehído (Esquema 11)^[22], ambos obtenidos como se ha indicado anteriormente (ver apartados 4.4. y 4.6. respectivamente).



Esquema 11

4.8. Síntesis de GPL

El objetivo del trabajo es la síntesis de una lecitina cuyo esqueleto de glicerol esté esterificado en *sn*-3 con fosfocolina, en *sn*-2 con un derivado del ácido araquidónico y en *sn*-1 con ácido palmítico. Para ello, se acila la posición *sn*-2 del 2-LPC con la cadena correspondiente.

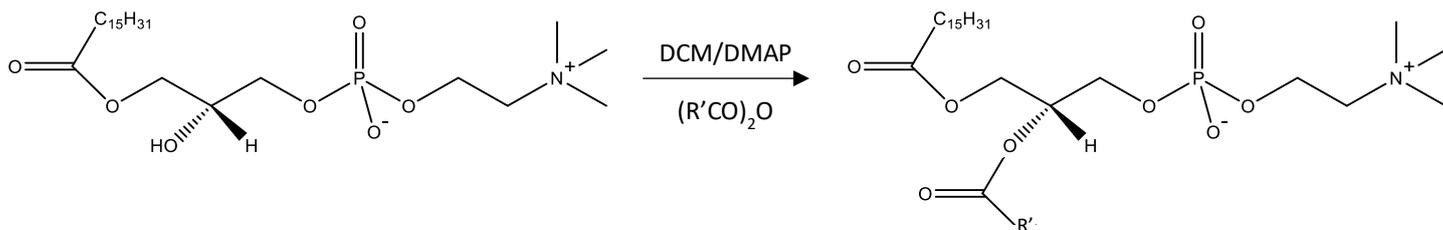
Existen dos alternativas para la esterificación en *sn*-2:

a. *Utilizando el anhídrido*^[5,6]

⁵ Paola D'Arrigo and Stefano Servi. Synthesis of Lysophospholipids. *Molecules* **2010**, *15*, 1354-1377. doi: 10.3390/molecules15031354

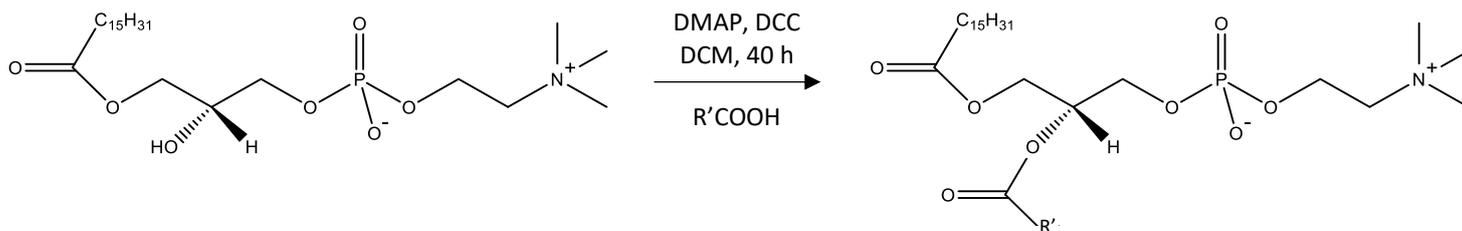
⁶ Paola D'Arrigo et al. A practical selective synthesis of mixed short/long chains glycerophosphocholines. *Chemistry and Physics of Lipids* **2007**, *147*, 113-118. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2007.03.008

²² James Ashenurst. Reactions of Grignard Reagents. *Organic Chemistry* **2020**.



Esquema 12

b. Utilizando el ácido^[7, 23]



Esquema 13

Resulta más eficiente seguir el segundo procedimiento con el fin de evitar la síntesis del anhídrido a partir del ácido y así emplear este directamente.

5. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Los objetivos de este trabajo son:

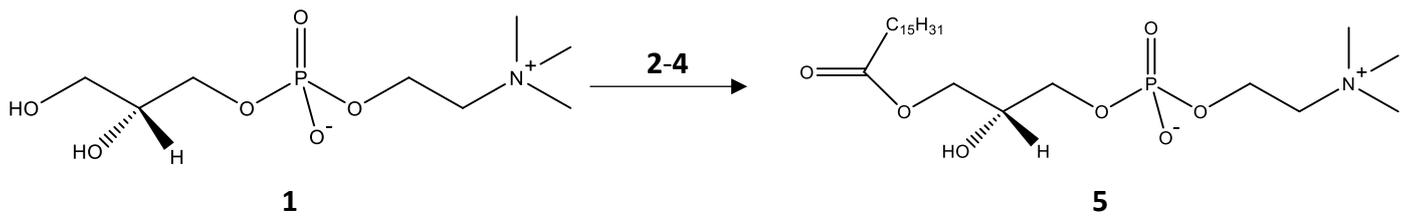
1. Síntesis de 2-LPC a partir de GPC y ácido palmítico (compuestos **1-5**).
2. Síntesis de un derivado de ácido araquidónico parcialmente oxidado a partir de 2-octín-1-ol y anhídrido glutárico (compuestos **6-19**).
3. Síntesis de la lecitina correspondiente a partir de 2-LPC y el derivado de ácido araquidónico anteriores (compuesto **20**).

Para la consecución de estos objetivos se ha llevado a cabo el diseño del siguiente plan de trabajo:

1. Síntesis de 2-LPC a partir de GPC y ácido palmítico, que entra en posición *sn*-1, dejando libre *sn*-2 donde se incorporará el derivado del ácido araquidónico (Esquema 14).

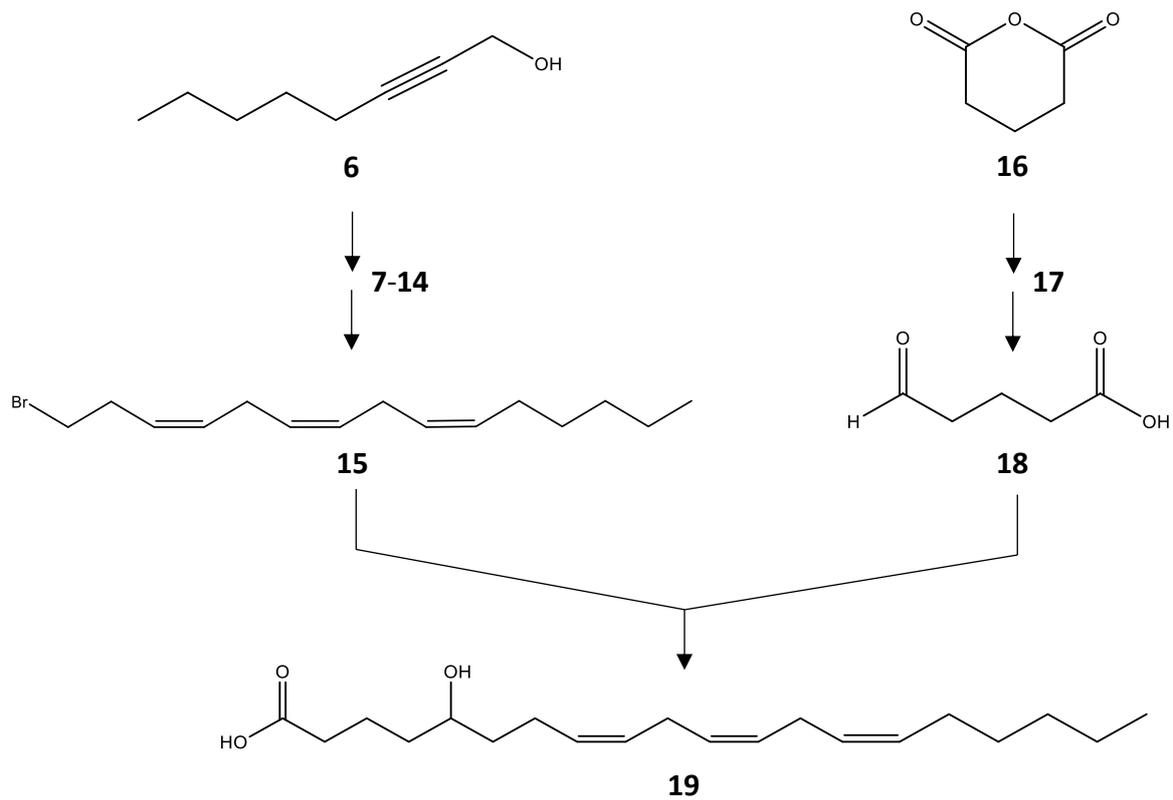
⁷ Natalia Niezgodá et al. Synthesis of Phosphatidylcholine with Conjugated Linoleic Acid and Studies on Its Cytotoxic Activity. *Aus. J. Chem.* **2013**, *66*, 354-361. doi: 10.1071/CH12404

²³ Alok Singh. An efficient synthesis of phosphatidylcholines. *J. Lipid Res.* **1990**, *31*, 1522-1525



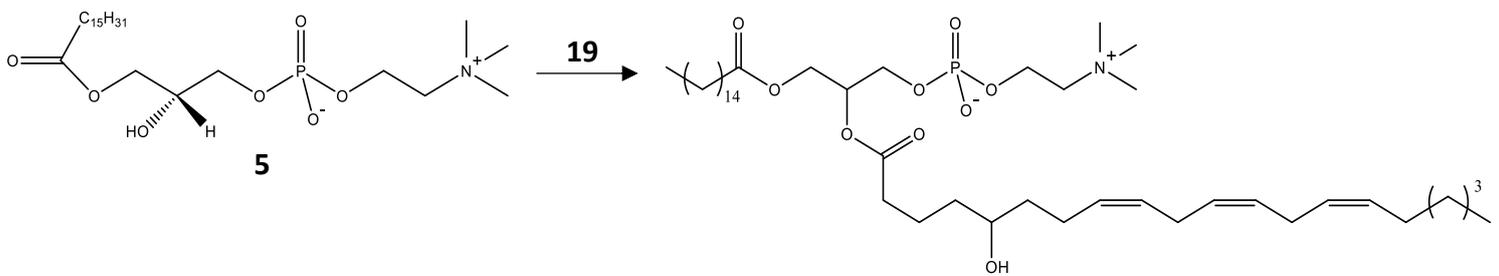
Esquema 14

2. Síntesis de un derivado de ácido araquidónico parcialmente oxidado a partir de 2-octín-1-ol y anhídrido glutárico (Esquema 15).



Esquema 15

3. Síntesis de la lecitina correspondiente a partir de 2-LPC y el derivado de ácido araquidónico anteriores (Esquema 16).



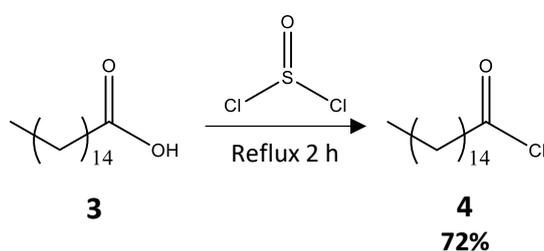
Esquema 16

En la actualidad existen múltiples estudios, líneas de investigación y artículos relacionados con el tema de lípidos bioactivos y lipidómica y, junto con lo mencionado en el apartado 3., justifican la pertinencia del trabajo.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Síntesis de cloruro de palmitoilo

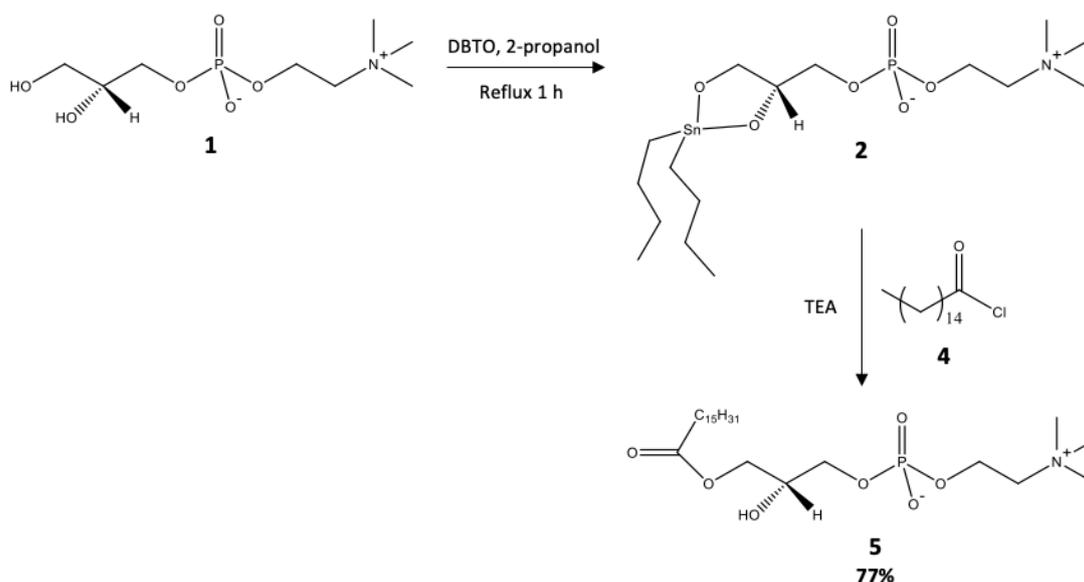
La síntesis de 1-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (2-LPC) utiliza cloruro de palmitoilo para la esterificación del ácido palmítico en la posición *sn*-1. Este se prepara fácilmente por reacción de ácido palmítico con cloruro de tionilo (Esquema 17) y posterior destilación.



Esquema 17

6.2. Síntesis de 1-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (2-LPC)

El proceso de acilación mediado por estaño de la posición *sn*-1 de GPC requiere dos etapas: primero, se hace reaccionar GPC con DBTO en 2-propanol, lo que implica la formación de un derivado cíclico de estaño y, a continuación, se hace reaccionar con cloruro de palmitoilo en presencia de TEA (Esquema 18).



Esquema 18

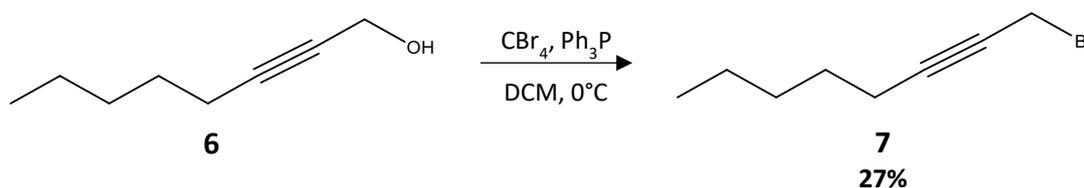
Tras la reacción, aparece un sólido blanco que debe filtrarse antes del tratamiento de la misma. La solución resultante se trata con agua y éter metil terci-butílico y la fase acuosa recogida se concentra al vacío. El crudo obtenido se disuelve en etanol y precipita con acetona a -10°C . El resultado fue un producto muy higroscópico y un bajo rendimiento (31%). Para intentar mejorarlo, se eliminó esta etapa y el crudo de las siguientes reacciones se purificó directamente en columna de sílica gel (65:25:4 $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$). Si bien el compuesto seguía siendo muy higroscópico, se mejoró la pureza y el rendimiento (77%).

6.3. Síntesis de 1-bromo-2-octino

Todas las reacciones llevadas a cabo utilizan 2-octín-1-ol como reactivo de partida al ser este comercial. Se ensayaron las distintas estrategias ya mencionadas (ver apartado 4.2.):

6.3.1. Reacción con CBr_4 y Ph_3P

Se prepara una mezcla con CBr_4 , 2-octín-1-ol y Ph_3P en DCM y se deja agitando overnight a 0°C (Esquema 19). El resultado fue un aceite incoloro cuyo espectro de ^1H NMR indicaba la presencia tanto del 2-octín-1-ol de partida como del producto final.



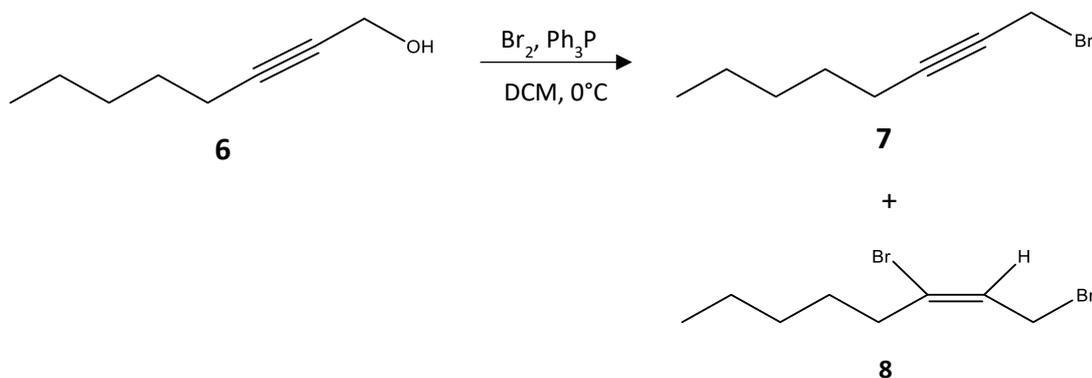
Esquema 19

6.3.2. Reacción con Br_2 y Ph_3P

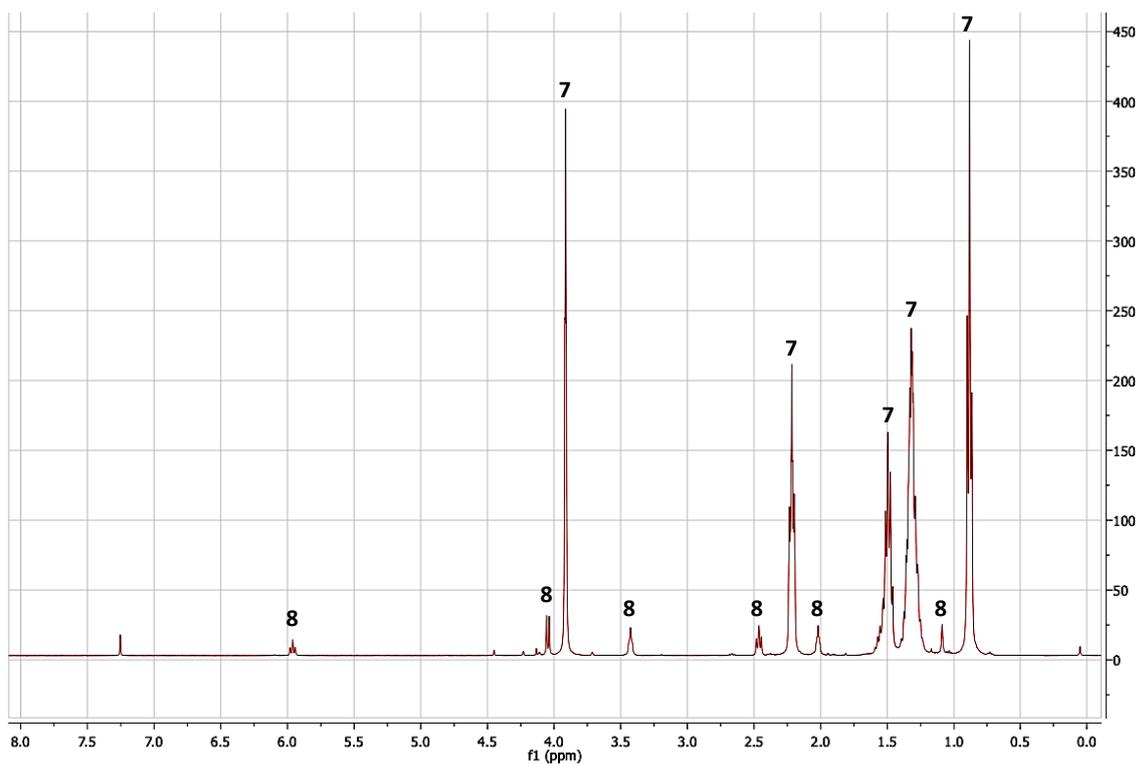
Con el objetivo de aumentar el rendimiento de la reacción, también se ensayó con Br_2 y Ph_3P , de los que se emplearon 1.3 equivalentes en lugar de 1.1 como inicialmente.

Se prepara primero una mezcla con Br_2 y Ph_3P en DCM que se agita durante 15 minutos a 0°C para permitir la formación de la sal correspondiente y, a continuación, se añade 2-octín-1-ol en DCM (Esquema 20). El seguimiento se realiza por cromatografía en capa fina (1:4 $\text{AcOEt}/\text{Heptano}$). El resultado fue un aceite incoloro del que se obtuvo un bajo rendimiento (27%) y, además, el espectro de ^1H NMR indicaba la presencia del compuesto de interés pero también otros picos que no se correspondían con el reactivo

de partida ni el producto final. El bajo rendimiento se puede explicar porque gran cantidad del compuesto pudo quedar retenido con el $O=PPh_3$, que se intentó recuperar lavando el sólido con éter metil terc-butílico y/o ciclohexano y, en cuanto a lo referido al espectro, además del producto de interés este indicaba la presencia de otro compuesto, resultado de la halogenación del alquino de partida como impureza.

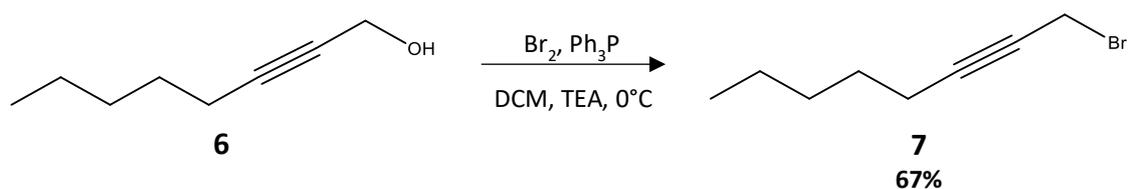


Esquema 20



Dado que la impureza encontrada proviene del proceso de hidrobromación sobre el alquino de partida, las siguientes reacciones se realizaron en presencia de una base como TEA. En este caso, se prepara primero una mezcla con Br_2 y Ph_3P en DCM que se agita durante 15 minutos a 0°C para permitir la formación de la sal correspondiente y, a continuación, se añade 2-octín-1-ol con TEA en DCM (Esquema 21). El resultado fue un aceite incoloro del que se obtuvo mejor rendimiento que en el caso anterior (67%) y

cuyo espectro de ^1H NMR indicaba que estaba puro (la impureza se logró eliminar por completo utilizando 2 equivalentes de TEA).

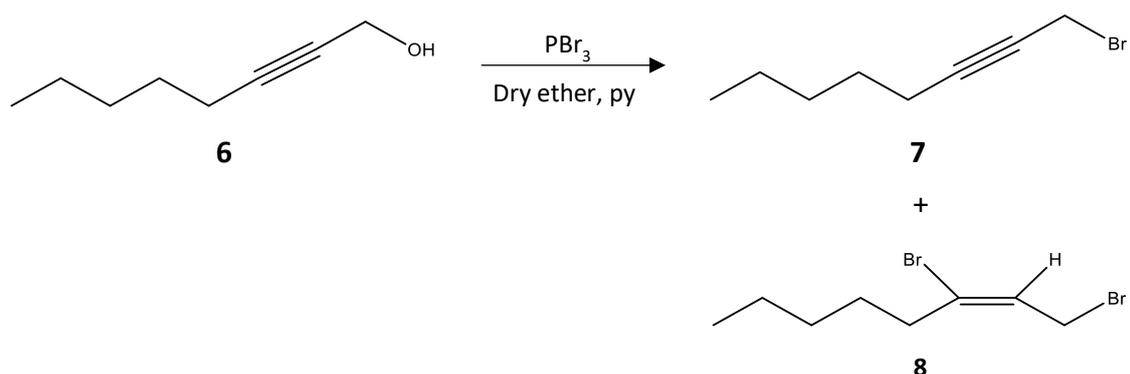


Esquema 21

El inconveniente de esta reacción es que, cuando se realiza con mayor cantidad del reactivo de partida, el sólido que se forma de O=PPh_3 es por tanto mayor y el rendimiento disminuye notablemente. Para evitarlo, se suprimió el tratamiento de la reacción con heptano y posterior extracción y, en su lugar, la mezcla de reacción se hizo pasar directamente por columna con abundante sílica gel (heptano), tras lo que se obtuvo un aceite incoloro. De esta forma, se mejoró la pureza y el rendimiento.

6.3.3. Reacción con PBr_3

La síntesis del bromoalquino también se probó con PBr_3 . En este caso, se prepara una mezcla con 2-octín-1-ol, PBr_3 y piridina en éter seco y se deja agitando (Esquema 22). El seguimiento se realiza por cromatografía en capa fina (1:4 AcOEt/Heptano). El resultado fue un aceite naranja cuyo espectro de ^1H NMR indicaba tanto la presencia del compuesto de interés, como de la impureza anteriormente mencionada.



Esquema 22

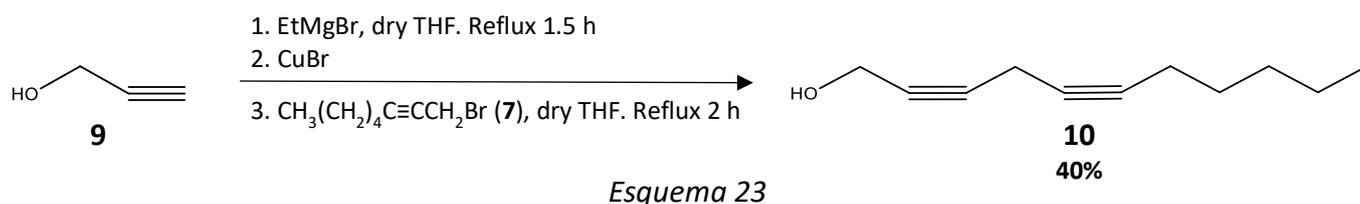
Dadas las reacciones estudiadas, los mejores resultados los reportan las síntesis con Br_2 y Ph_3P .

6.4. Síntesis de 2,4-undecadiín-1-ol

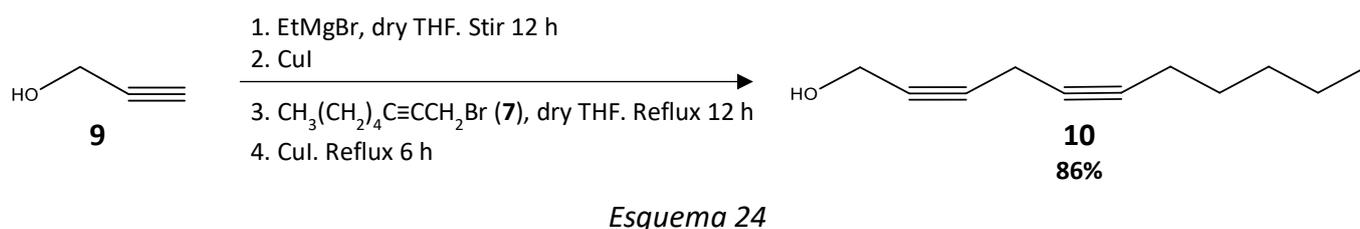
La alquilación del alcohol propargílico con el haluro obtenido en la etapa anterior (ver apartado 6.3.) se lleva a cabo con un organomagnesiano en presencia de un haluro

de Cu (I) como catalizador. Inicialmente, se trabajó con EtMgBr comercial y, posteriormente, la reacción se llevó a cabo preparándolo *in situ*.

La reacción se realiza en atmósfera inerte, añadiendo EtMgBr sobre alcohol propargílico en THF seco. La mezcla se calienta a reflujo durante 1.5 h y, después, se añade CuBr a temperatura ambiente. Una vez disuelto, se añade 1-bromo-2-octino sintetizado anteriormente y se calienta a reflujo durante 2 h (Esquema 23). Tras el tratamiento y extracción correspondientes, el resultado fue un aceite naranja que se purificó en columna de sílica gel (1:8 AcOEt/Heptano) (rendimiento 40%).



Cuando se genera el organomagnesiano *in situ*, primero se obtiene este por reacción de Mg con bromoetano en THF seco. Luego, se añade alcohol propargílico en THF seco a 0°C y se deja agitando 12 h a temperatura ambiente. Después, se añade CuI y, una vez disuelto, se añade 1-bromo-2-octino en THF seco. La mezcla de reacción se calienta a reflujo 12 h y, finalmente, se añade de nuevo CuI a temperatura ambiente y la mezcla se calienta a reflujo 6 h adicionales (Esquema 24). Tras el tratamiento correspondiente, el resultado fue un aceite naranja. Siguiendo esta otra estrategia, se mejoró la pureza y el rendimiento (86%).



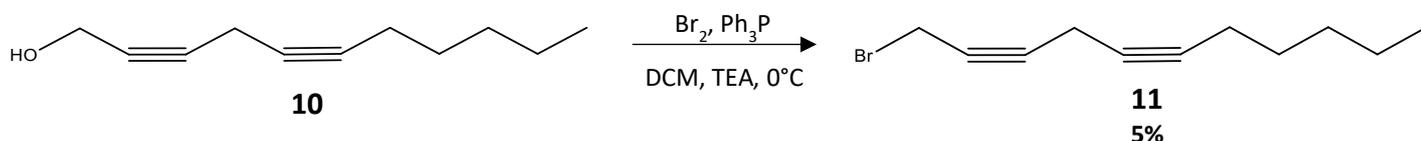
6.5. Síntesis de 1-bromo-2,4-undecadiino

Su síntesis es análoga a la del 1-bromo-2-octino (ver apartado 6.2.). Se ensayaron las siguientes estrategias:

6.5.1. Reacción con Br₂ y Ph₃P

Se prepara primero una mezcla con Br₂ y Ph₃P en DCM que se agita durante 15 minutos a 0°C para permitir la formación de la sal correspondiente y, a continuación, se

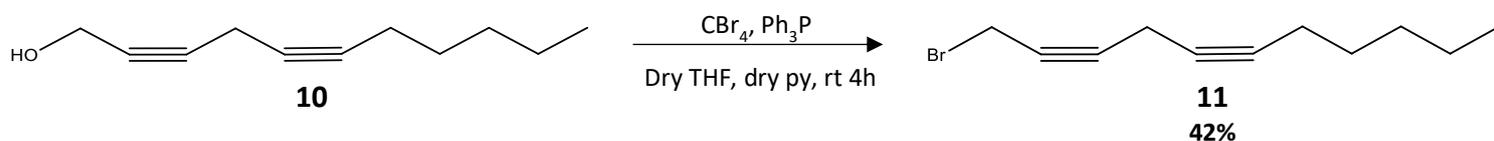
añade 2,4-undecadiín-1-ol sintetizado anteriormente, con TEA en DCM (Esquema 25). El resultado fue un producto que se purificó en columna de sílica gel (heptano) tras lo cual, apenas se obtuvo compuesto.



Esquema 25

6.5.2. Reacción con CBr_4 y Ph_3P

Como alternativa, se ensayó la reacción con CBr_4 y Ph_3P . Se prepara una mezcla con 2,4-undecadiín-1-ol sintetizado anteriormente, Ph_3P , piridina seca y CBr_4 en THF seco y se deja agitando 4 h a temperatura ambiente (Esquema 26). El resultado fue un producto que se purificó en columna de sílica gel (1:1 AcOEt/Heptano), tras lo que se obtuvo un aceite naranja cuyo espectro de ^1H NMR indicaba que se trataba del compuesto de interés (el rendimiento fue bajo, del 42%, pero muy superior al obtenido en la reacción anterior).

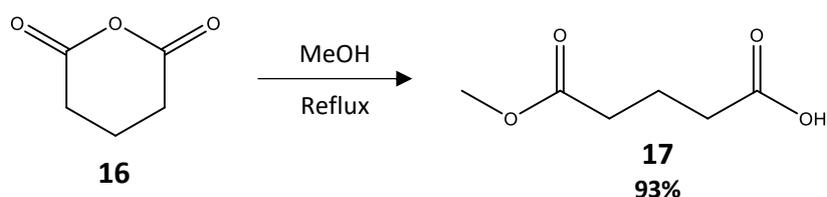


Esquema 26

Dadas las reacciones estudiadas, en este caso la síntesis con CBr_4 y Ph_3P reportó mejores resultados.

6.6. Síntesis del ácido 4-metoxycarbonilbutanoico

El ácido **17** se obtiene por apertura del anillo de anhídrido glutárico en metanol (Esquema 27). El seguimiento se realiza por cromatografía en capa fina (1:4 AcOEt/Heptano) y, una vez completada, la mezcla de reacción se concentra al vacío. La reacción es cuantitativa.



Esquema 27

7. CONCLUSIONES

Atendiendo a las circunstancias originadas por la pandemia 2019-2020 por COVID-19, se cumplieron los siguientes objetivos:

1. Se logró sintetizar 1-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (2-LPC) a partir de GPC y ácido palmítico.
2. No se logró sintetizar el derivado de ácido araquidónico parcialmente oxidado, pero sí los compuestos **7**, **10** y **11** (si bien este último no se logró purificar), así como el compuesto **16**.
3. No se logró sintetizar la lecitina, pues aunque se obtuvo el 2-LPC, no se pudo realizar la esterificación de la posición *sn*-2 ya que el derivado del ácido araquidónico no se sintetizó.

El proceso global planteado inicialmente es extensivo para la síntesis de cualquier GPL, atendiendo a los restos de las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 en cada caso.

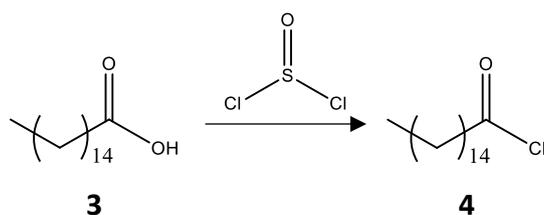
8. MATERIALES Y MÉTODOS

Tanto los reactivos como disolventes empleados se obtuvieron de Sigma-Aldrich y Acros Organics. En el caso de los disolventes anhidros, estos fueron secados utilizando tamices moleculares previamente activados.

El seguimiento de las reacciones por cromatografía en capa fina se realizó con placas de sílica y, la detección, empleando un detector fluorescente (254 nm) así como diversos reveladores, fundamentalmente ácido fosfomolibdico.

En cuanto a los espectros de ^1H NMR (400 MHz), ^{13}C NMR (101 MHz) y HSQC, se obtuvieron en un equipo de *Agilent Technologies* del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de Valladolid (LTI). Los desplazamientos químicos δ de estos, se expresan en partes por millón (ppm), utilizando tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. En el caso de ^1H NMR, los datos se expresan como δ (ppm) (multiplicidad (s: singlete, d: doblete, t: triplete, td: triplete de dobletes, tt: triplete de tripletes, q: quintuplete, m: multiplete), constante de acoplamiento, integración).

8.1. Síntesis de cloruro de palmitoilo (4)

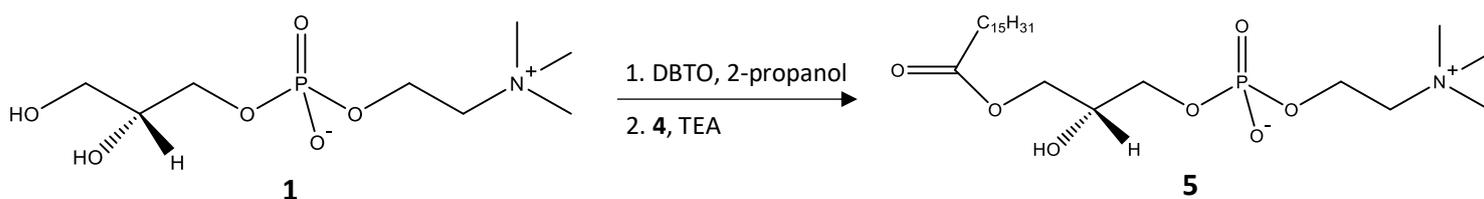


Una mezcla de ácido palmítico (20 g, 0.078 mol) y cloruro de tionilo (11.6 mL, 0.16 mol) se calienta a reflujo 2 h. Completada la reacción, el cloruro de palmitoilo se purifica por destilación (162°C, 0.8 torr)²⁴ para obtener **4** como un líquido incoloro (15.5 g, 72%).

δ_{H} (400 MHz, CDCl_3): 2.88 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.70 (q, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.29 (m, 24H), 0.87 (td, $J=7.2$ Hz, 3H).

δ_{C} (101 MHz, CDCl_3): 47.11, 31.91, 29.63, 29.50, 29.32, 29.04, 28.41, 25.03, 22.68, 14.08.

8.2. Síntesis de 1-palmitoíl-*sn*-glicero-3-fosfolina (2-LPC) (5)



Una suspensión de GPC (1g, 3.9 mmol) y DBTO (1.1 g, 4.4 mmol) en 2-propanol (40 mL) se calienta a reflujo 1 h. A temperatura ambiente, la mezcla de reacción se trata con TEA (0.7 mL, 5 mmol) y **4** (1.5 mL, 5 mmol). Tras 15 minutos de agitación, se filtra el sólido blanco formado y la solución resultante se trata con agua (40 mL) y extrae con éter metil terc-butílico (40 mL). La solución hidro-alcohólica recogida se extrae tres veces con éter metil t-butílico (3 x 40 mL) y se concentra al vacío. El crudo obtenido se purifica en columna de sílica gel (65:25:4 $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$) para obtener **5** como un sólido blanco muy higroscópico (1.5 g, 77%).

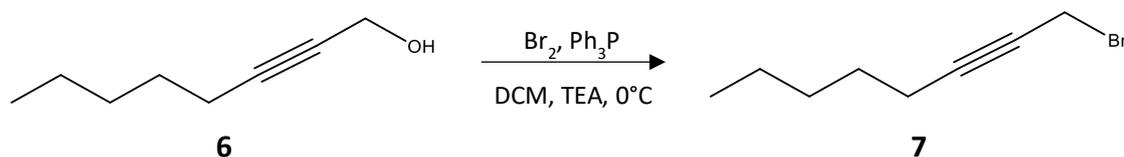
δ_{H} (400 MHz, MeOD): 4.29 (m, 2H), 4.13 (m, 2H), 3.97 (m, 1H), 3.89 (m, 2H), 3.65 (m, 2H), 3.23 (s, 9H), 2.35 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.60 (q, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.29 (m, 24H), 0.88 (t, $J=7.2$ Hz, 3H).

²⁴ Sigma-Aldrich. Palmitoyl chloride.

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIAL/76152?lang=es®ion=ES>

δ_C (101 MHz, MeOD): 173.65, 68.40, 66.40, 66.03, 64.82, 59.04, 53.29, 48.44, 46.36, 33.49, 31.67, 29.36, 20.20, 29.04, 28.82, 24.60, 22.32, 13.06, 7.80.

8.3. Síntesis de 1-bromo-2-octino (7)

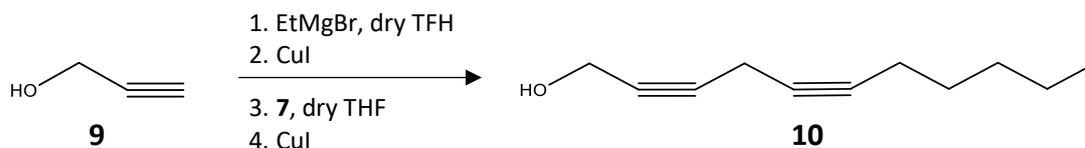


Sobre una disolución de Ph_3P (2.71 g, 10.34 mmol) en DCM (40 mL) se añade Br_2 (0.53 mL, 10.34 mmol) gota a gota a 0°C. Tras 15 minutos de agitación, se añade gota a gota una disolución de 2-octín-1-ol (1 g, 7.95 mmol) y TEA (2.22 mL, 15.9 mmol) en DCM (15 mL) y se agita a 0°C. El seguimiento de la reacción se realiza por cromatografía en capa fina (1:4 AcOEt/Heptano). Una vez completada, la mezcla de reacción se concentra al vacío y el contenido restante se trata tres veces con heptano (3 x 100 mL). Se filtra el sólido blanco formado y la solución resultante se lava con una disolución saturada de NaCl (100 mL), se seca con $MgSO_4$ anhidro, se filtra y concentra al vacío. El producto obtenido se purifica en columna de sílica gel (heptano) para obtener **7** como un aceite incoloro (1 g, 67%).

δ_H (400 MHz, $CDCl_3$): 3.92 (m, 2H), 2.21 (tt, $J=7.2, 2.4$ Hz, 2H), 1.50 (q, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.31 (m, 4H), 0.89 (t, $J=7.2$ Hz, 3H).

δ_C (101 MHz, $CDCl_3$): 88.33, 75.23, 30.97, 28.03, 22.19, 18.82, 15.69, 13.91.

8.4. Síntesis de 2,4-undecadién-1-ol (10)



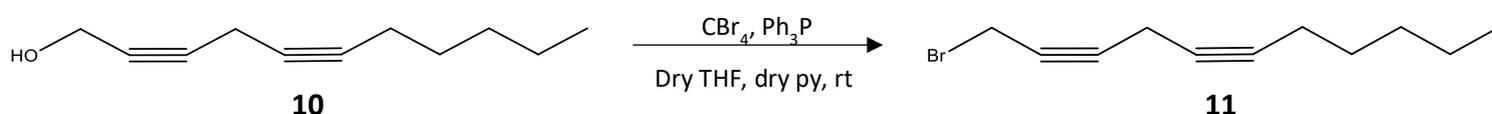
Sobre una suspensión de magnesio (0.41 g, 16.7 mmol) en THF seco (10 mL) se añade lentamente una disolución de bromoetano (1.19 mL, 16 mmol) en THF seco (15 mL). Tras 20 minutos de agitación, se añade alcohol propargílico (0.49 mL, 8.5 mmol) en THF seco (8 mL) gota a gota a 0°C y se agita 12 h a temperatura ambiente. Se añade CuI (0.038 g, 0.2 mmol), se agita 15 minutos, se añade gota a gota **7** (1 g, 5.3 mmol) en THF seco (2 mL) y se calienta a reflujo 12 h. Por último, se añade otra alícuota de CuI (0.038 g, 0.2 mmol), se agita 15 minutos y se calienta a reflujo 6 h adicionales. La mezcla de reacción se vierte en H_2SO_4 2N (25 mL) y hielo (10 g) y se extrae con éter metil terc-

butílico (3 x 50 mL). La fase orgánica recogida se lava con una disolución saturada de NH_4Cl (50 mL), una disolución saturada de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_3$ (50 mL) y una disolución saturada de NaCl (50 mL), se seca con MgSO_4 anhidro, se filtra y concentra al vacío para obtener **10** como un aceite naranja (0.75 g, 86%).

δ_{H} (400 MHz, CDCl_3): 4.22 (t, $J=2.4$ Hz, 2H), 3.16 (q, $J=2.4$ Hz, 2H), 2.13 (tt, $J=7.2, 2.4$ Hz, 2H), 1.46 (q, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.30 (m, 4H), 0.86 (t, $J=7.2$ Hz, 3H).

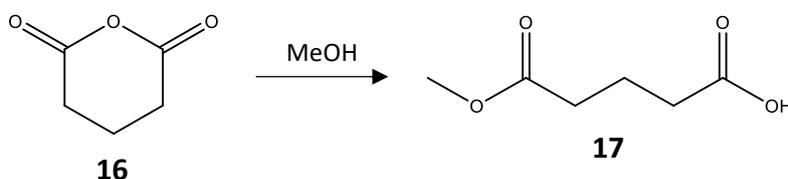
δ_{C} (101 MHz, CDCl_3): 81.16, 80.71, 78.32, 73.24, 51.12, 31.01, 28.33, 22.15, 18.60, 13.90, 9.78.

8.5. Síntesis de 1-bromo-2,4-undecadieno (**11**)



Sobre una disolución de **10** (0.8 g, 4.88 mmol) en THF seco (15 mL) se añade Ph_3P (9.2.56 g, 76 mmol), piridina seca (0.39 mL, 4.88 mmol) y CBr_4 (1.62 g, 4.88 mmol) y se agita 4 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluye con agua y se extrae con éter metil terc-butílico (3 x 20 mL). La fase orgánica recogida se lava con HCl 1M (20 mL) y una disolución saturada de NaCl (2 x 20 mL), se seca con MgSO_4 anhidro, se filtra y concentra al vacío. El sólido obtenido se tritura con ciclohexano (2 x 50 mL) y la solución resultante se concentra al vacío. El producto obtenido se purifica en columna de sílica gel (1:1 AcOEt/Heptano) para obtener **11** como un aceite naranja (0.45 g, 40%).

8.6. Síntesis del ácido 4-metoxicarbonilbutanoico (**9**)



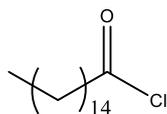
Una mezcla de anhídrido glutárico (20 g, 0.18 mol) y metanol (200 mL, 4.94 mmol) se calienta a reflujo. El seguimiento de la reacción se realiza por cromatografía en capa fina (1:4 AcOEt/Heptano). Una vez completada, la mezcla de reacción se concentra al vacío para obtener **17** como un líquido incoloro (24 g, 93%).

δ_{H} (400 MHz, CDCl_3): 10.23 (s, 1H), 3.59 (s, 3H), 2.33 (m, 4H), 1.86 (q, $J=7.1$ Hz, 2H).

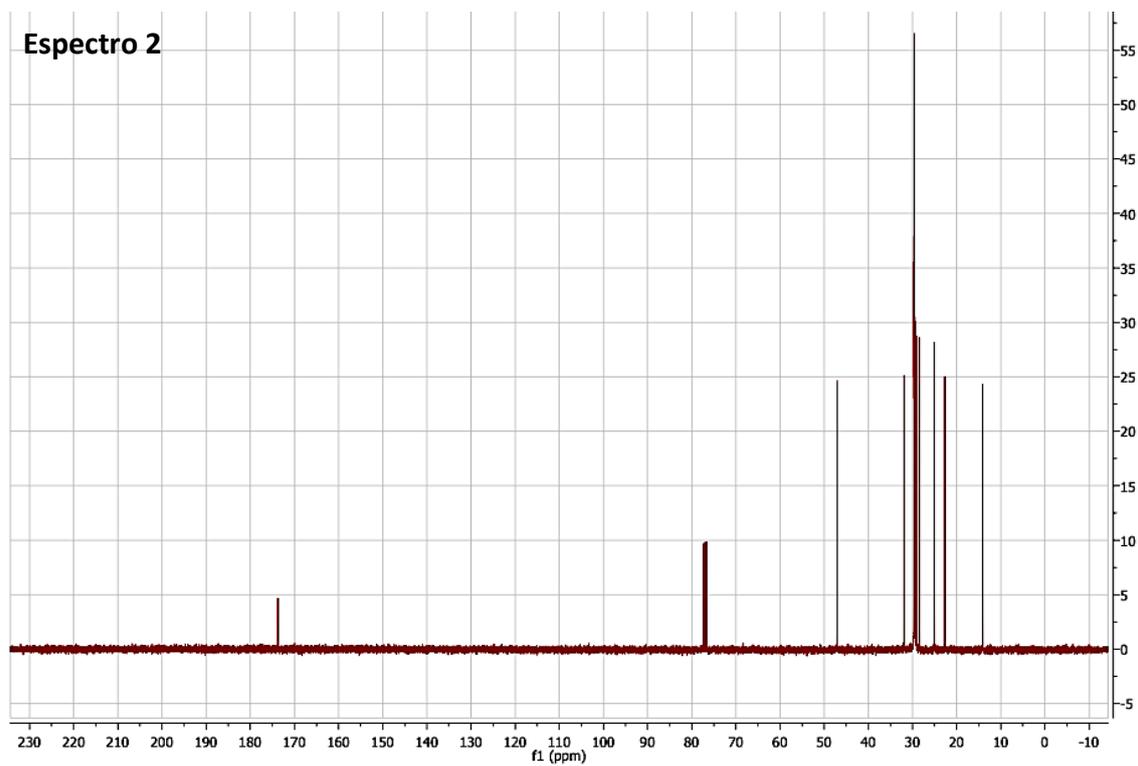
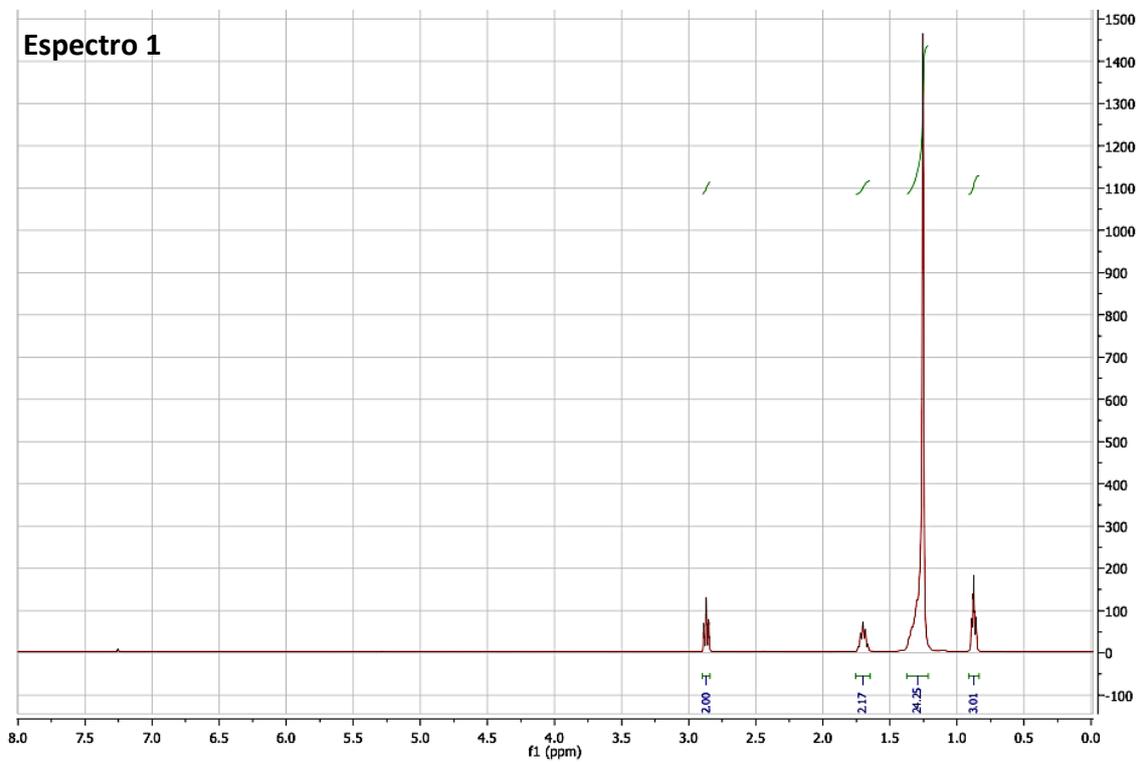
δ_{C} (101 MHz, CDCl_3): 178.59, 173.34, 51.50, 32.85, 19.68.

9. ANEXO: ^1H , ^{13}C , HSQC, MS

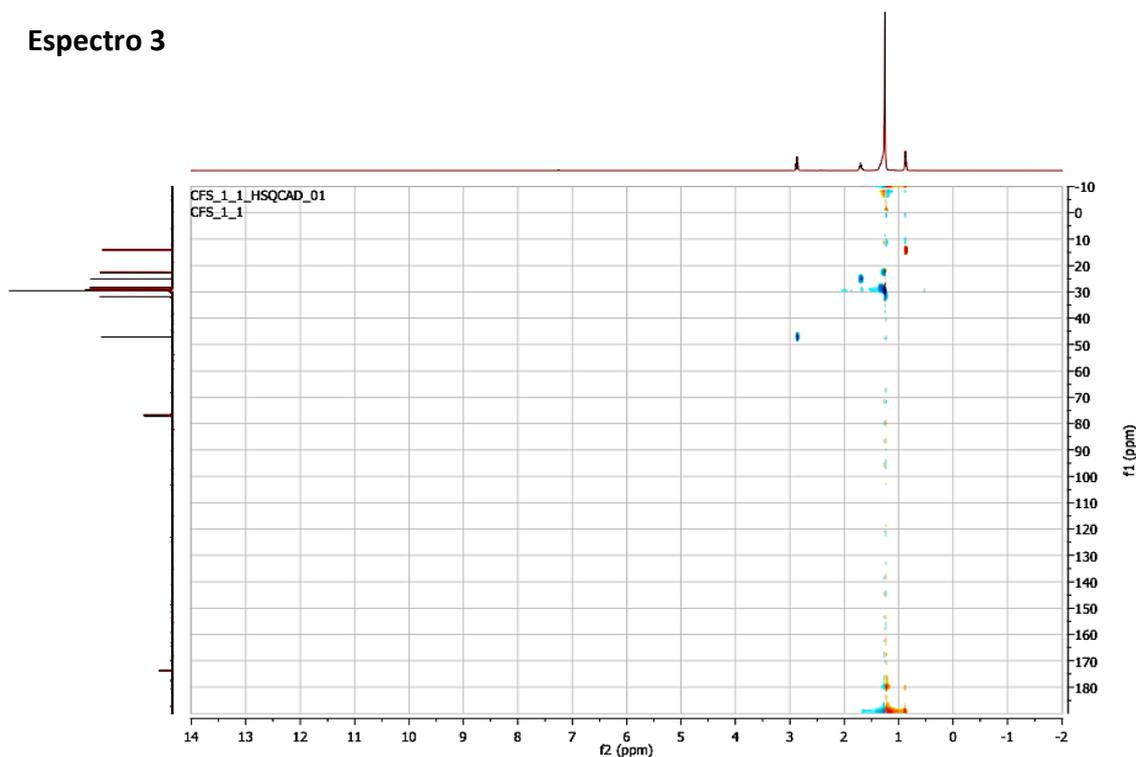
Compuesto 4: cloruro de palmitoílo



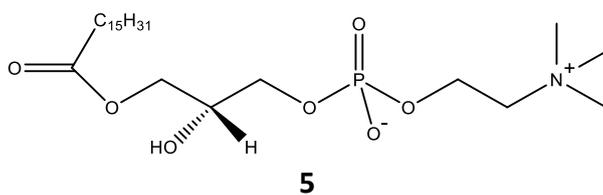
4



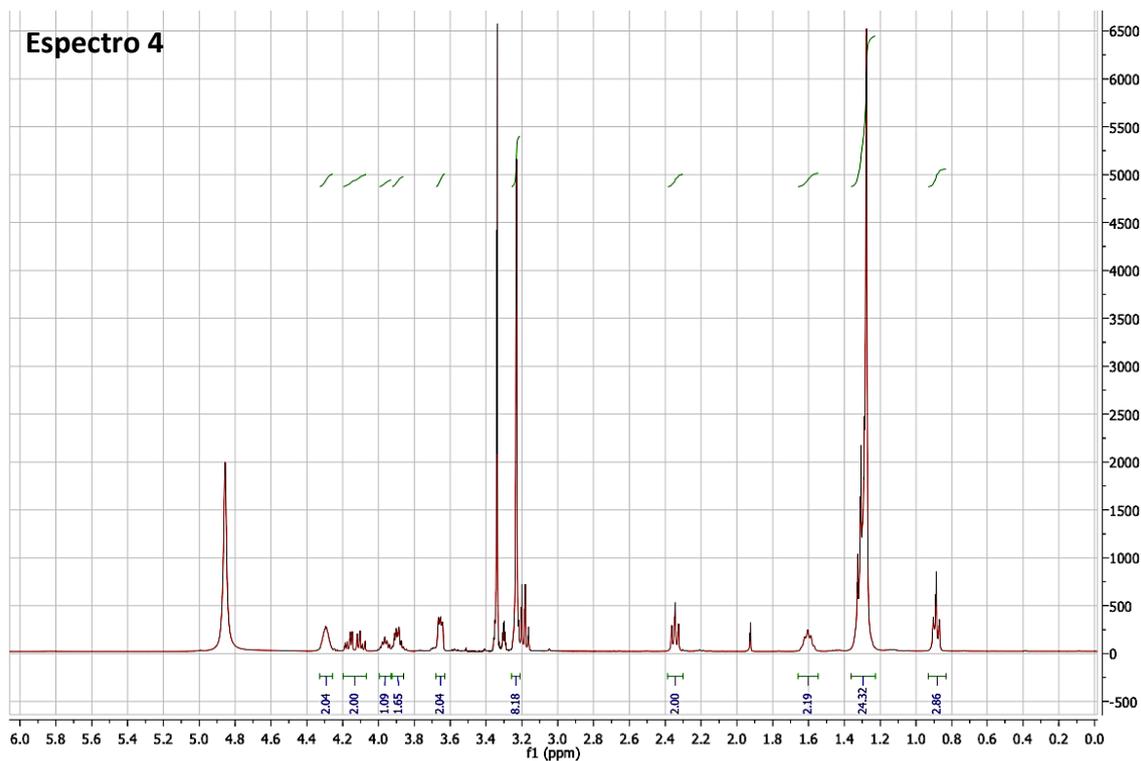
Espectro 3



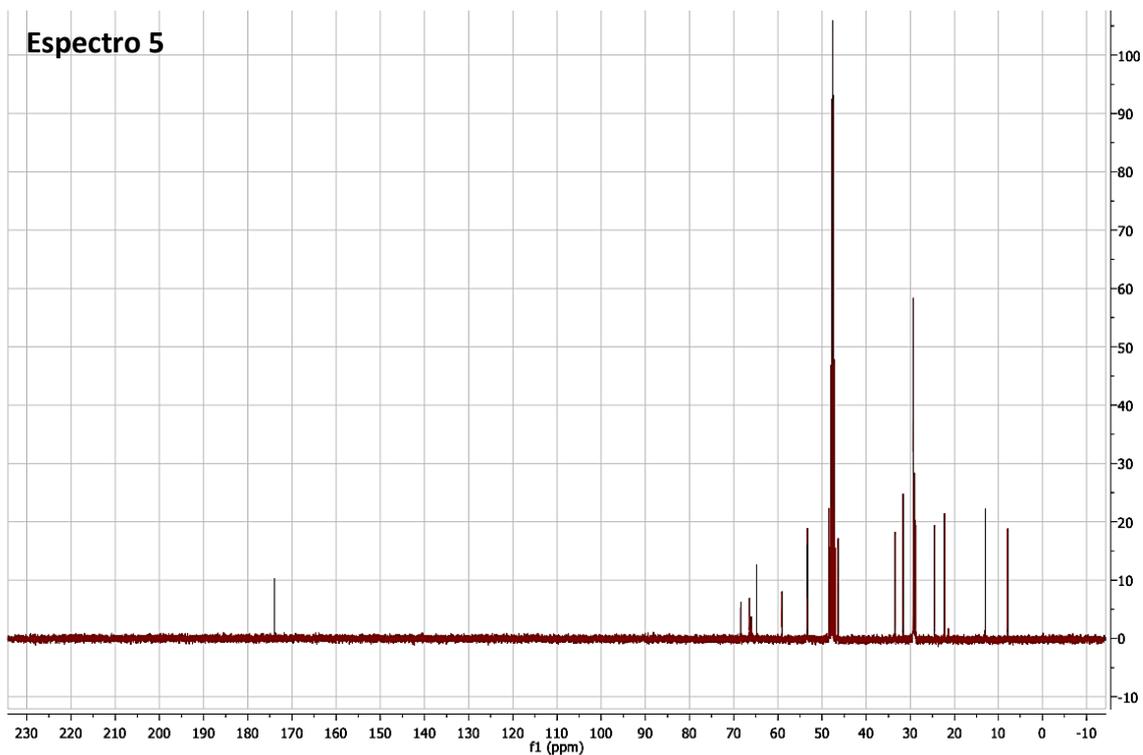
Compuesto 5: 1-palmitoil-sn-glicerol-3-fosfolina (2-LPC)



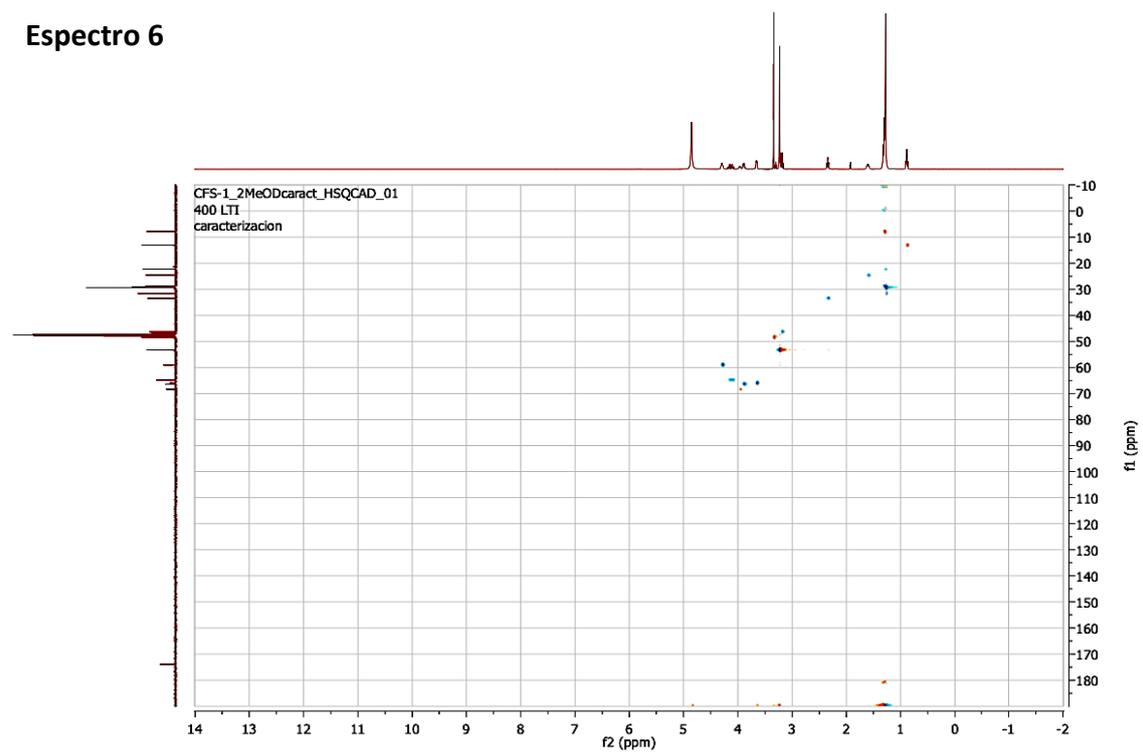
Espectro 4



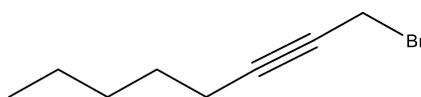
Espectro 5



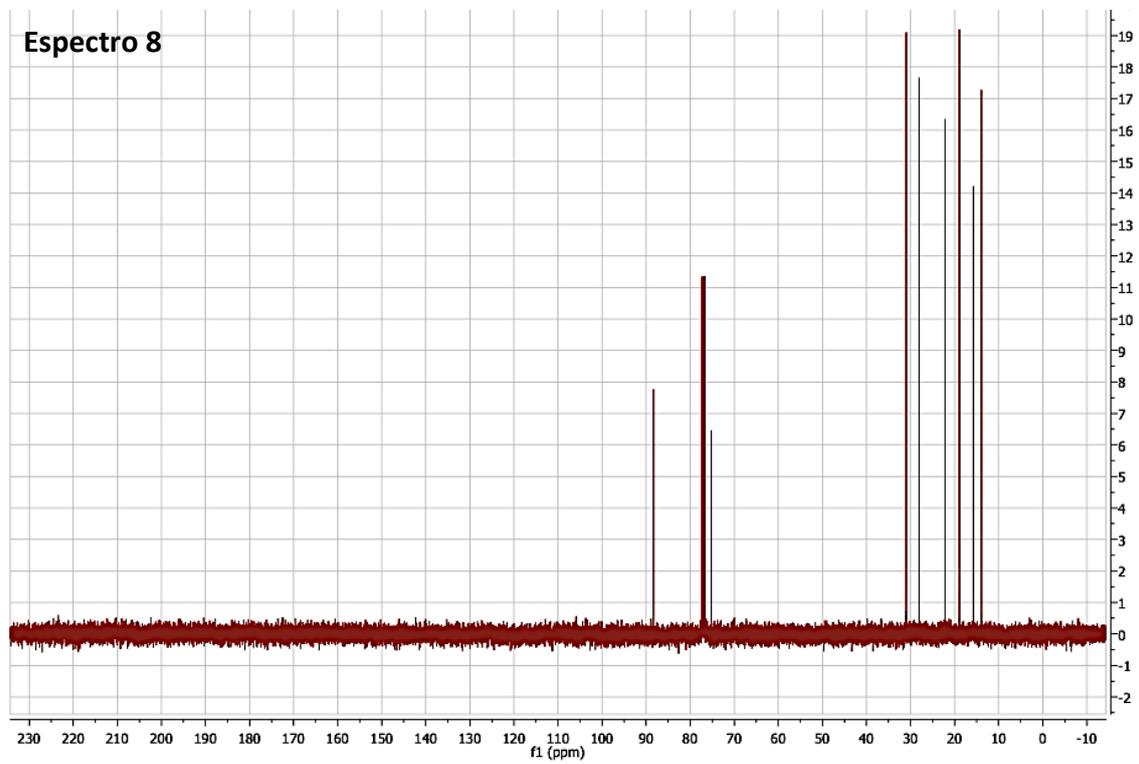
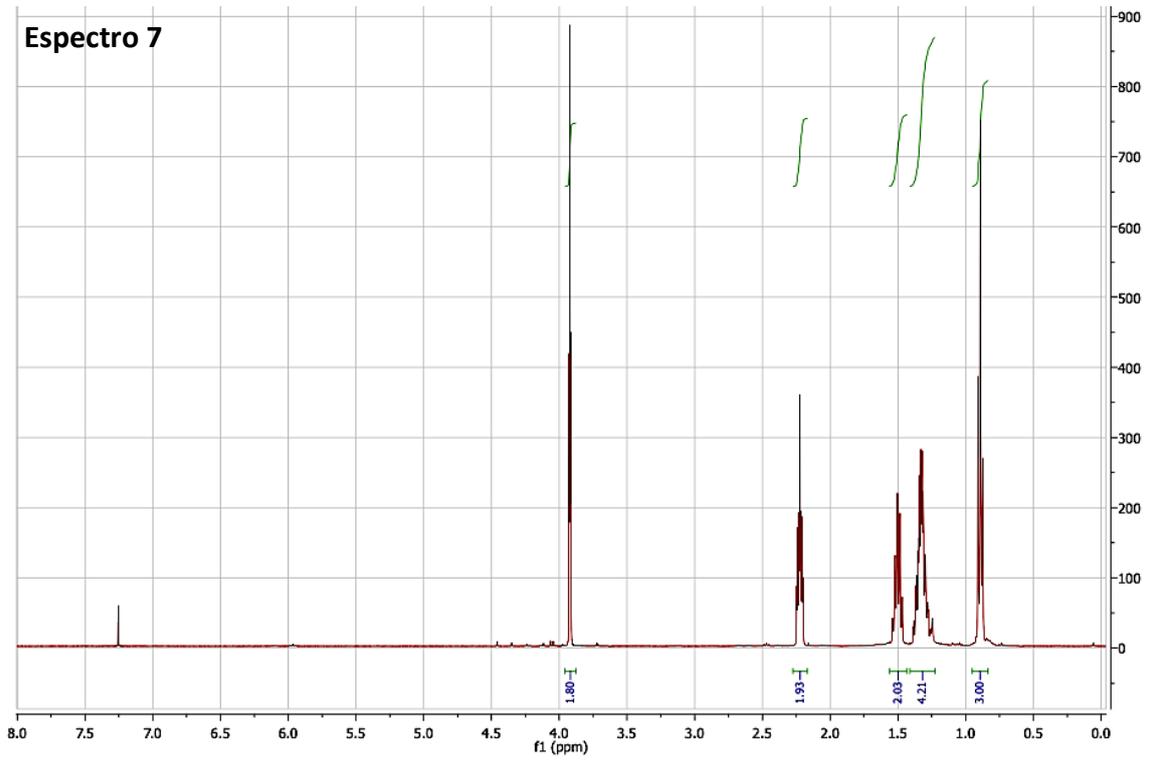
Espectro 6



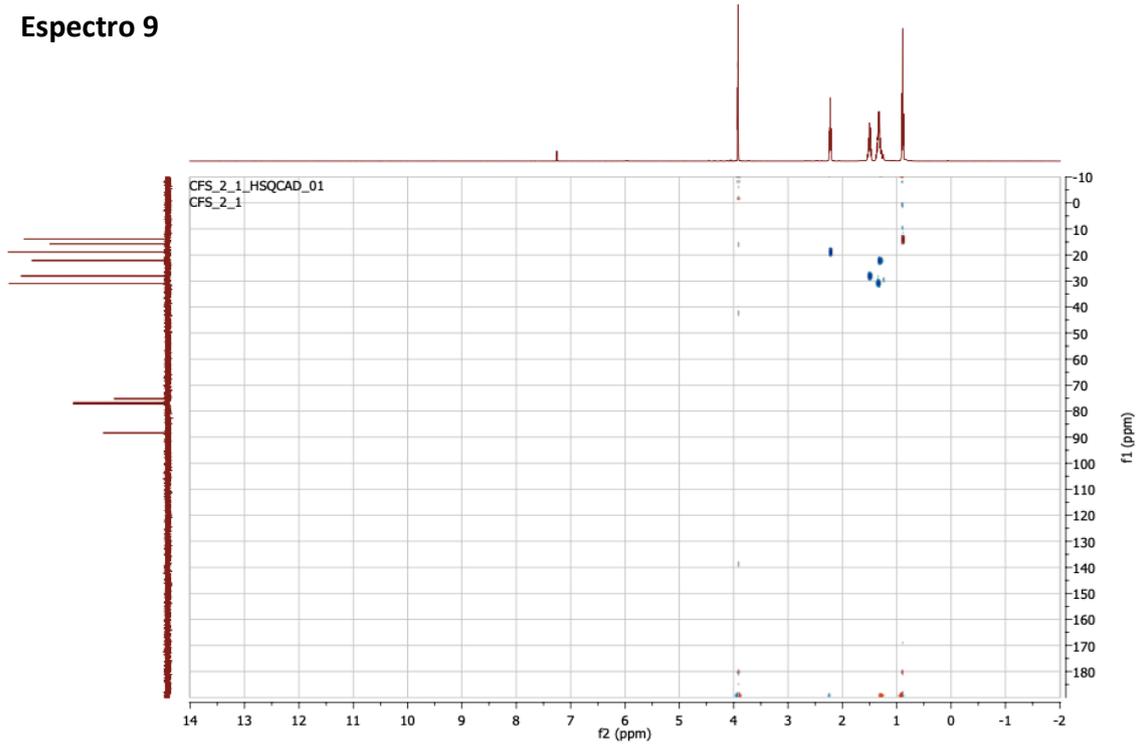
Compuesto 7: 1-bromo-2-octino



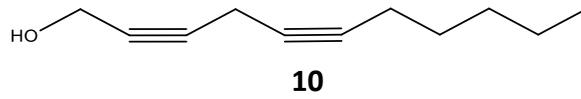
7



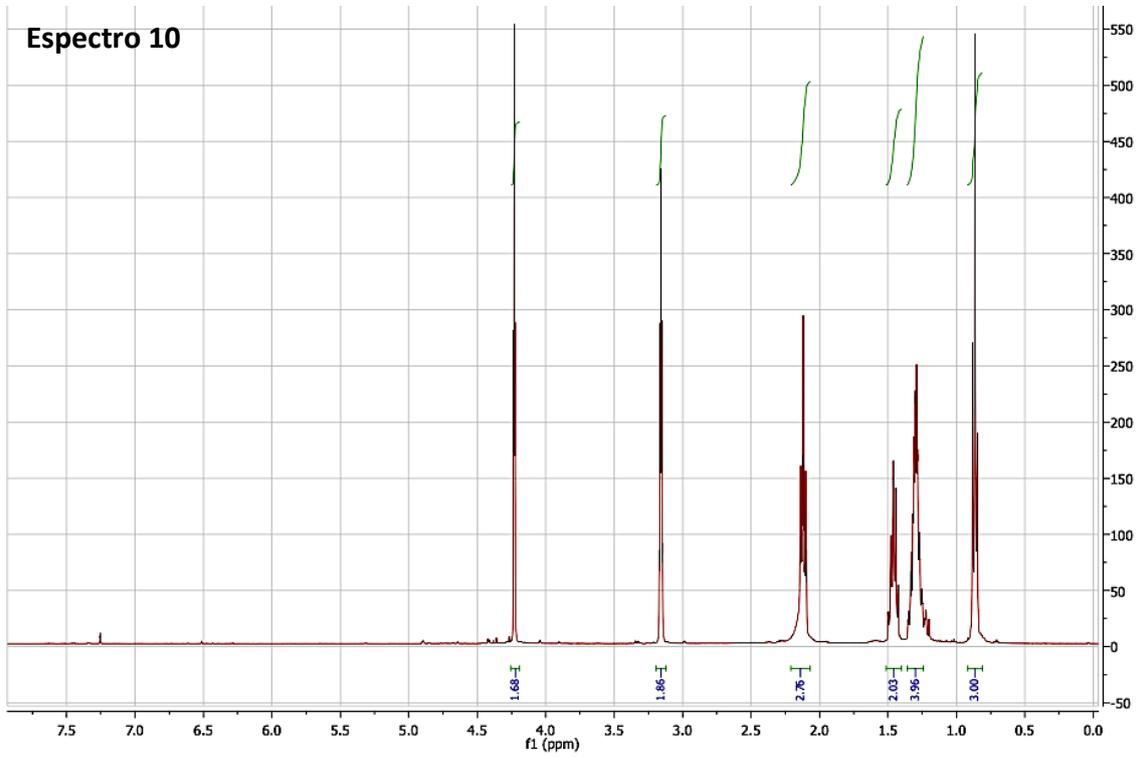
Espectro 9

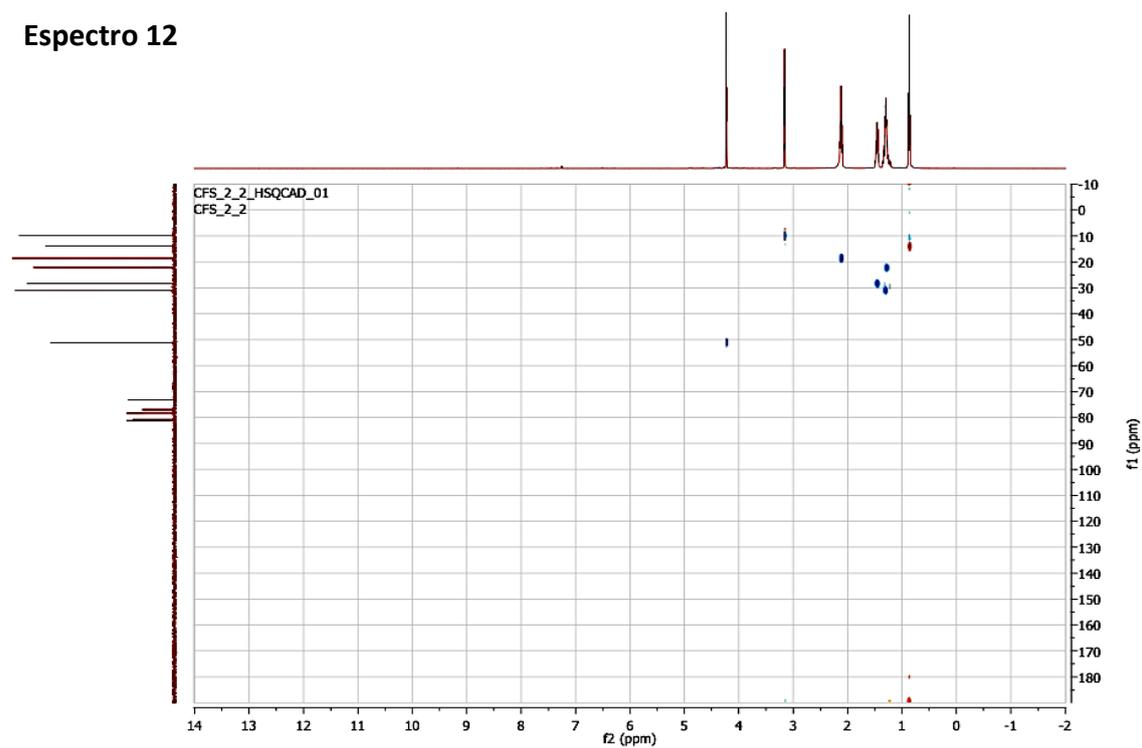
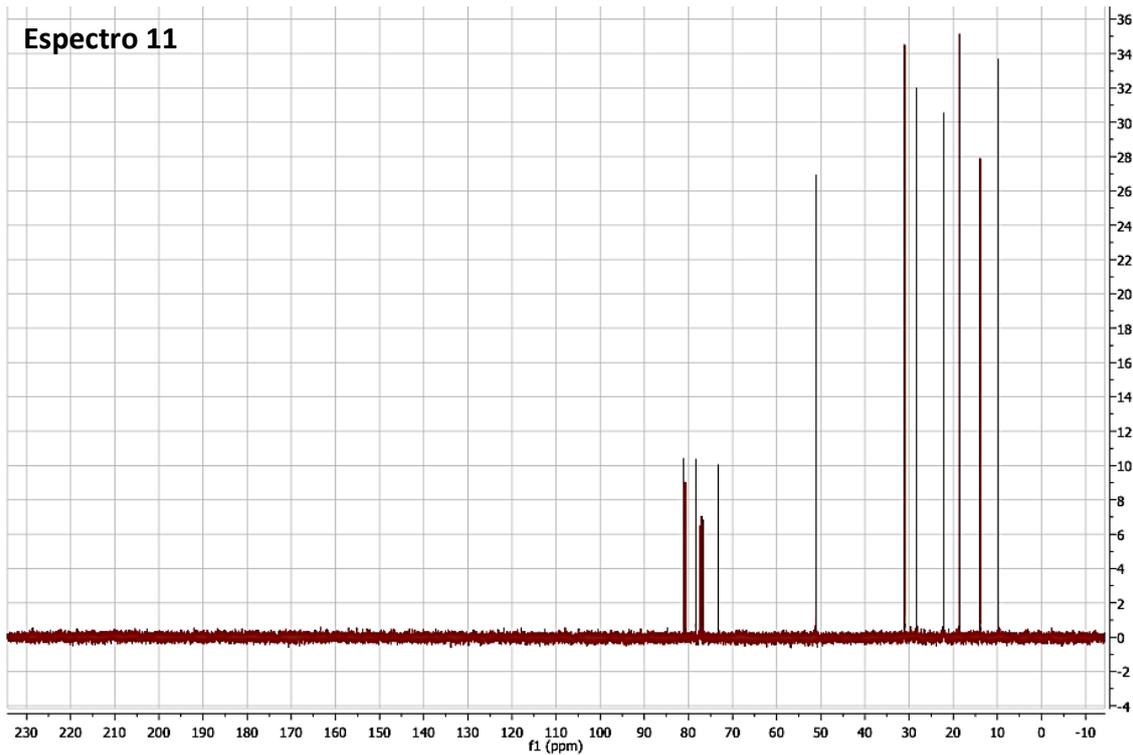


Compuesto 10: 2,4-undecadién-1-ol

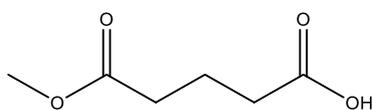


Espectro 10

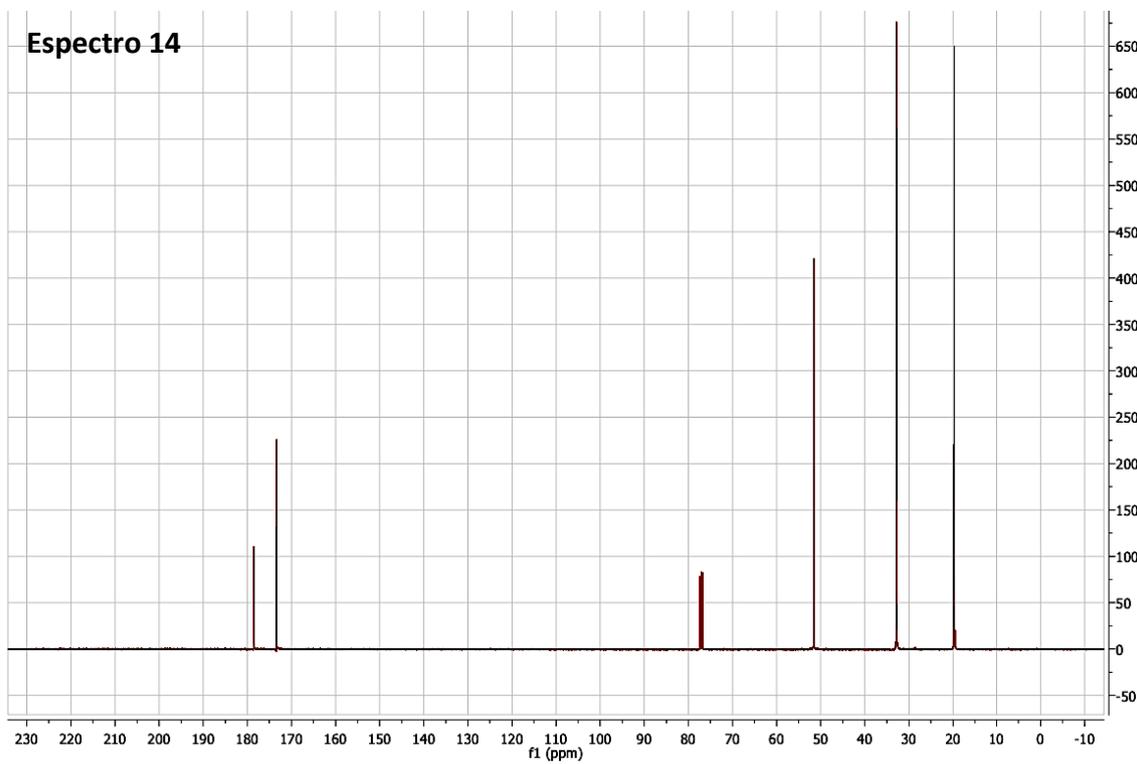
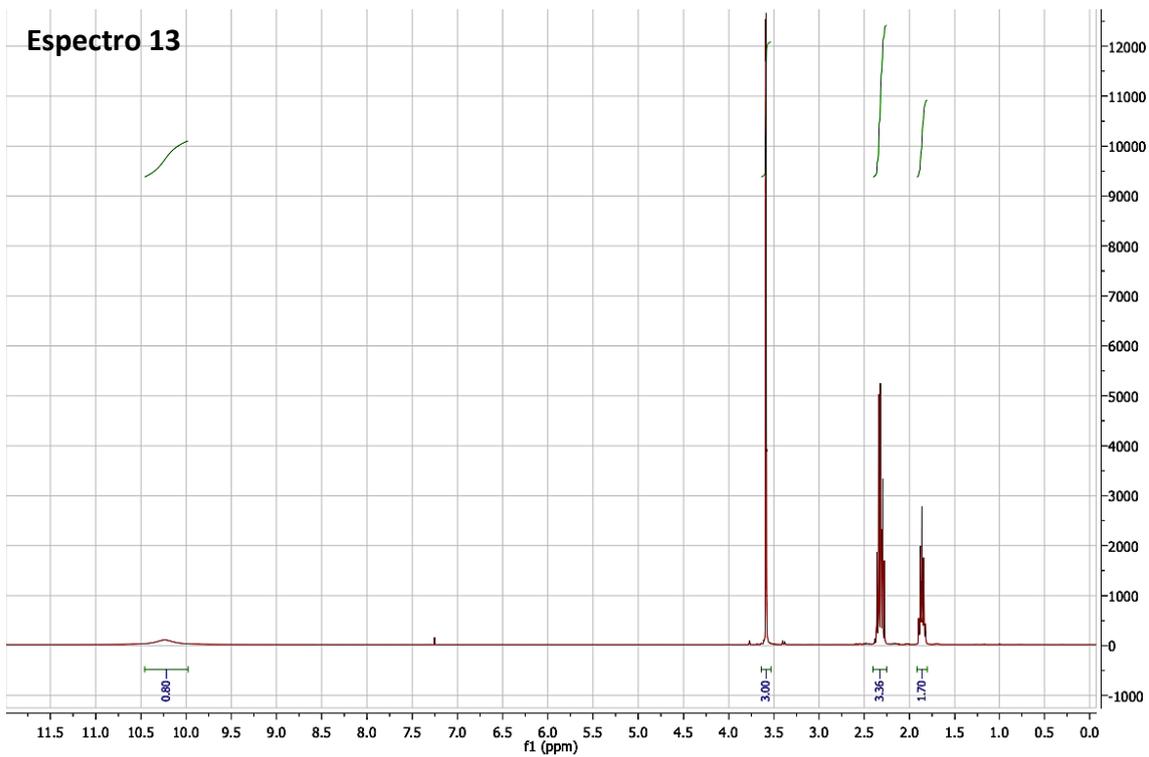




Compuesto 17: ácido 4-metoxicarbonilbutanoico



17



Espectro 15

